



HAL
open science

Modifications du transcriptome au cours du développement postnatal du cervelet dans un modèle murin de Trisomie 21

Julien Laffaire

► **To cite this version:**

Julien Laffaire. Modifications du transcriptome au cours du développement postnatal du cervelet dans un modèle murin de Trisomie 21. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2008. Français. NNT: . pastel-00004252

HAL Id: pastel-00004252

<https://pastel.hal.science/pastel-00004252>

Submitted on 22 Oct 2008

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

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



THESE DE DOCTORAT

Spécialité : neurobiologie

ED 3C

Cerveau - Cognition - Comportement

Présentée par

Julien LAFFAIRE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS VI
PIERRE ET MARIE CURIE

Modifications du transcriptome au cours du développement postnatal du cervelet dans un modèle murin de Trisomie 21.

soutenue le 10 septembre 2008

devant le jury composé de :

Pr Ann LOHOF
Dr Pierre-Marie SINET
Pr Reiner VEITIA
Pr Roger Harper REEVES
Dr Catherine NGUYEN
Dr Nicole CREAU
Dr Marie-Claude POTIER

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse



THESE DE DOCTORAT

Spécialité : neurobiologie

ED 3C

Cerveau - Cognition - Comportement

Présentée par

Julien LAFFAIRE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS VI
PIERRE ET MARIE CURIE

Modifications du transcriptome au cours du développement postnatal du cervelet dans un modèle murin de Trisomie 21.

soutenue le 10 septembre 2008

devant le jury composé de :

Pr Ann LOHOF
Dr Pierre-Marie SINET
Pr Reiner VEITIA
Pr Roger Harper REEVES
Dr Catherine NGUYEN
Dr Nicole CREAU
Dr Marie-Claude POTIER

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse

Remerciements

Je voudrais remercier en premier lieu le Pr Jean Rossier, directeur de l'UMR 7637, pour m'avoir accueilli dans son unité et pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux durant ces 3 années.

Toute ma reconnaissance va naturellement au Dr Marie-Claude Potier qui a encadré cette thèse et a mis à ma disposition tout ce dont j'avais besoin pour mener à bien mes travaux. Je l'a remercie également pour la liberté d'organisation qu'elle m'a accordée et les nombreux congrès auxquels j'ai participé.

Je remercie les membres de mon jury : le Pr Ann Lohof qui a aimablement accepté de le présider, le Dr Pierre-Marie Sinet et le Pr Reiner Veitia qui ont accepté de lire mon manuscrit durant l'été, le Pr Roger Reeves et le Dr Catherine Nguyen qui ont accepté de faire le déplacement jusqu'à Paris ainsi que le Dr Nicole Créau.

Rien n'aurait été possible sans la collaboration active du Dr Isabelle Rivals, Je la remercie pour sa disponibilité, sa patience et sa compétence.

Ces 3 années ne se seraient jamais aussi bien passées sans la bonne entente qui règne dans l'équipe des Pucés. Je voudrais donc remercier ici les Drs Luce Dauphinot et Tania Vitallis pour leur aide technique de qualité, et Jack-Christophe Harry Cossec pour sa bonne humeur très matinale. Je n'oublie pas les Drs Vincent Studer et Jean-Christophe Galas, les anciens (le Dr Emilie Graison, le Dr Nathalie Bontoux, le Dr Randal X Moldrich, Fabien Pasteau et le Dr Larence Ettwiller) ainsi que les ouvrières de la onzième heure : les Drs Catherine Marquer et Laili Mahmoudian. Je remercie enfin Alexandre Bacq et Aurore Coudrais pour le travail et la constante bonne humeur qu'ils ont montrés

au cours de leurs stages.

Je remercie l'ensemble du laboratoire de Neurobiologie et Diversité Cellulaire pour leur sympathie et leur soutien : les spécialistes de la douleur : Karine Thibault, le Dr Sophie Pezet et le Pr Bernard Calvino ; les électriciens du cerveau : le Dr Isabelle Ferezou, le Dr Armelle Rancillac, le Dr Anina Moritz, Quentin Perrenoud et le Dr Thierry Gallopin ; la tribu des Prots : Iman Haddad, Anne-Marie Hesse, Emmanuelle Demey, Segan Ndiaye, le Dr Paulo Marcelo, le Dr Yann Verdier et le Dr Joëlle Vinh ; les accros au cannabis : Anne Simon, Alexandre Roland et le Dr Zsolt Lenkei et même les mouches (!) : Julien Sejourne, Eric Leglou, le Dr Nicolas Gervasi, le Dr Guillaume Isabel, le Dr Nikki Scaplehorn, le Dr Julien Colomb, le Dr Paul Tchenio, Anne-Laure Belair, le Dr Michel Chaminade, Annie Piton, le Dr Valérie Goguel et le Dr Thomas Prémat. Sans oublier Bob et Cindy évidemment.

Je voudrais remercier spécialement Hélène Geoffroy et Sylvie Boulet pour l'amitié qu'elles m'ont témoignée au cours de ces années. Je les remercie pour leur confiance, leur sympathie mais aussi leur compétence.

Je veux également remercier Marcel Léopoldie pour s'être si bien occupé de mes chères petites souris trisomiques.

Je remercie toutes les personnes qui se sont investies dans ce projet. Je veux citer le Dr Ralph Sinkus et son étudiant en thèse Benoît Larrat ainsi que le Dr Isabelle Dusart et Rosine Wehrlé et le Dr Yann Hérault pour le travail et le savoir-faire qu'ils ont mis en œuvre au cours de nos collaborations.

Tous les campus possèdent leurs sociétés secrètes et je dois reconnaître que sans elles l'ambiance aurait été bien différente. Je remercie donc le cercle du Jeudi Bière, le groupe des Mots-Croisés ainsi que le clan des Horoscopes du Matin. Karine et Jack, que de bons moments en votre compagnie ! Au labo, au bistrot, en France, en Europe ou aux USA ! De bons moments également lors de nos dîners en présence de Sophie, Aurélie et Florence !

Je veux remercier mes parents, Yvette et Christian Laffaire, pour toutes ces années heureuses, pour leur patience et leur compréhension, pour la liberté qu'ils m'ont accordée et l'éducation qu'ils m'ont apportée. Je remercie mon frère Sébastien et sa femme Nathalie pour leur soutien, et pour Mathieu qui fait le bonheur de tous et dont je serai fier et heureux d'être le parrain. Je n'oublie pas le reste de ma famille pour les encouragements et la curiosité qu'ils m'ont témoignés.

Je remercie le père Dominique Chéreau pour sa présence, son amitié et ses conseils depuis tant d'années. Je remercie l'équipe d'animation du GAC pour leur dévouement passé, présent et à venir ainsi que l'équipe des Jeunes Pros pour leurs encouragements. Je veux citer tout spécialement le frère Patrick Gotillot, Gilles Bourda, Pascal Niffoi et Manuela Pam.

Je remercie David, 10 ans déjà ! Et ce n'était pas joué d'avance Mr Giganti ! Le pire binôme de TP et pourtant le meilleur. Je remercie également Jessica (merci encore pour tes cours de fac et les rapports de projet !! ☺), Eddy (pas de panique tout se passera bien !), Jérôme (ingénieur, docteur, souvent insupportable mais toujours présent, merci) et Vincent (toujours de bonne humeur malgré... ☺). Merci pour votre soutien, votre amitié et votre présence dans les moments difficiles, vos encouragements et tant de bons moments. Je n'oublie pas les derniers venus : mon tragique et so overkitch voisin Nicolas, Frédéric et tous ces fabuleux papillons de lumière, Alexandre et Carlos (et KM !), Príncipes de Tango et compagnon de toile. Je remercie également Jon et Garry pour leur accueil et leur amitié à Barcelone.

Je remercie les Drs Sheila Harroch et Smaragda Lam(p/b)rianou pour la formation scientifique qu'elles m'ont donnée, les dégustations de la carte des desserts Le Nôtre entre 2 crises et toutes ces Pasteur's gossip sessions ! Je remercie également Sheila pour m'avoir fait intégrer l'Institut Pasteur et fait découvrir le Weizman Institute. Je n'ai pas oublié le Dr Judith Chebath, je la remercie pour son humanité et son exemple.

Je tiens également à remercier la Fondation Jérôme Lejeune et le consortium européen anEUploidy qui ont financés mes travaux.

Je remercie le journal 20minutes pour tant de lutes contre Alzheimer. Je remercie également Milka, LU, Kinder et Nespresso pour m'avoir fourni (légalement) de quoi tenir le coup. Je n'oublie pas Thao Ly pour son succulent menu du midi ainsi que Sushiko pour ses délicieux sushis.

Enfin, je remercie toutes les personnes qui ont eu la patience d'assister à ma soutenance de thèse et l'amitié de me rejoindre autour d'un verre afin de vivre avec moi 'le premier jour du reste de ma vie' (Daho et al., 1998) !

Table des matières

Remerciements	v
Table des matières	ix
Liste des figures	xi
Liste des tableaux	xiii
Résumé	xv
Abstract	xvi
Introduction	1
1 De la Trisomie 21	2
1.1 De l'idiotie à la Trisomie 21	3
1.2 Caractéristiques cliniques de la Trisomie 21	5
1.2.1 Caractéristiques craniofaciales et anomalies du squelette	5
1.2.2 Cerveau, Cognition et Comportement	6
1.2.3 Malformations viscérales	8
1.2.4 Défaillance du système immunitaire	9
1.2.5 Troubles hormonaux	10
1.3 Épidémiologie, Étiologie et Mécanisme	12
2 Du chromosome 21	14
2.1 Cartographie du Chromosome 21	14
2.2 Contenu génique du Chromosome 21	15
2.3 Le protéome du Chromosome 21	16
2.4 Comparaison de la séquence du chromosome 21	18
3 Des modèles d'étude de la Trisomie 21	20
3.1 Les modèles de trisomie partielle	21
3.1.1 Ts16	21
3.1.2 Ts65Dn	21
3.1.3 Ts1Cje	23
3.1.4 Ms1/Ts65Dn	24
3.1.5 Ts1Rhr et Ms1Rhr/Ts65Dn	25

3.1.6	Ts1Yah et Ts2Yah	25
3.2	Les modèles trans-chromosomiques	26
3.2.1	Tc1	26
3.3	Les modèles murins monogéniques	28
3.4	Limitations des modèles murins	30
4	Des modifications de l'expression des gènes dans la Trisomie 21	31
4.1	Les puces à ADN	31
4.2	L'effet du dosage génique	34
4.3	Quelles conséquences sur le transcriptome ?	38
4.4	'Effet de dosage génique' ou 'rupture de l'homéostasie' ?	39
5	Hypothèses et objectifs de travail	41
5.1	Contexte	41
5.2	Pathologie du cervelet dans la Trisomie 21	42
5.3	Caractérisation du phénotype cérébelleux	44
5.4	Analyse du transcriptome au cours du développement du cervelet	45
5.5	Caractérisation du génome de la lignée Ts1Cje	45
	Matériels et Méthodes	47
	Les souris Ts1Cje	48
	Marquages immunohistochimiques	49
	Imagerie par résonance magnétique	53
	Analyse du transcriptome avec des puces RNG/MRC	55
	Analyse du transcriptome avec des puces Illumina	58
	Analyse du génome par puce CGH	60
	Mesure de l'expression des gènes par PCR quantitative en temps réel	62
	Résultats	66
1	Etude morphologique et histologique du cervelet	67
1.1	Réduction du volume du cervelet	67
1.2	Réduction de la prolifération des cellules granulaires	68
2	Étude du transcriptome au cours du développement du cervelet.	73
2.1	Les modifications du transcriptome chez la souris Ts1Cje.	84
2.2	Les gènes impliqués dans développement du cervelet.	88
2.3	Les gènes impliqués dans la prolifération des cellules granulaires.	90
3	Étude du transcriptome de la couche externe à la naissance.	93

4	Identification d'une monosomie partielle du chromosome 12	107
	Discussion	111
1	Validation de notre modèle d'étude	114
1.1	L'influence du fond génétique.	114
1.2	L'hypoplasie cérébelleuse est-elle spécifique à la Trisomie 21 ?	115
1.3	La délétion décelée invalide t-elle le modèle Ts1Cje ?	117
2	Quelle est l'origine de la diminution de la prolifération ?	121
2.1	Ce que nous apprennent les levures.	122
2.2	Une ou des modifications de la prolifération ?	123
2.3	Trisomie 21 et cancer	126
3	Les modifications du transcriptome	128
4	A la recherche des gènes candidats	134
4.1	Des stratégies mises en œuvre.	134
4.2	Etablissement du gène candidat.	136
	Conclusions et Perspectives	140
	Annexes	143
	Bibliographie	154
	Publications	172

Table des figures

1.1	Caryotype d'un individu porteur de Trisomie 21.	5
1.2	Schéma récapitulatif des principaux signes cliniques.	11
2.1	Régions synténiques entre les chromosome Hsa21 et Mmu10, 16 et 17 . . .	19
3.1	La souris Ts1Cje.	24
3.2	Comparaison entre les différents modèles murins de la Trisomie 21	27
4.1	Principe des puces à ADN	33
4.2	Principe des puces Illumina	34
4.3	Classification des gènes du chromosome 21.	37
5.1	Localisation du cervelet chez l'homme (a) et chez la souris (b)	42
5.2	Développement postnatal du cervelet.	43
5.3	Phénotypes cérébelleux chez la souris.	44
1.4	Génotypage des souris Ts1Cje par PCR.	50
5.5	IRM d'une souris Ts1Cje adulte	56
1.1	Marquage immunohistochimique anti-Ki67 du cervelet.	70
1.2	Index de prolifération des cellules granulaires	70
1.3	Coupes de cervelets de souris Ts1Cje (c,d) et contrôles (a,b,e,f) à E17 aux grossissement x20 ou x40.	72
2.1	Superposition des signaux Cy3 et Cy5 d'une puce à ADN.	74
2.2	Plan expérimental.	75
2.3	Effet du bruit de fond sur le signal	80
2.4	Symétrisation des données de puces	81
2.5	Distribution gaussienne des données.	81
2.6	Normalisation des rapports d'expression des gènes par LOWESS.	82
2.7	Test des paramètre du LOWESS	83
2.8	Arborisation des ontologies.	86
2.9	ACP des souris Ts1Cje et contrôles à P0, P3, P7 et P10.	89
2.10	Rapports d'expression de 22 gènes candidats obtenus par qPCR.	91
3.1	Proportions des gènes exprimés par puce.	95
3.2	Histogramme des signaux de fluorescences des puces Illumina.	96
3.3	Indices de corrélation des puces Illumina.	97
3.4	ACP et classification de l'expression des gènes selon la normalisation. . .	99
3.5	Distribution des rapports d'expression dans la CGE à P0.	101

3.6	Moyenne des rapports d'expression par chromosome.	102
3.7	ACP et classification de l'expression des gènes dans l'EGL.	106
4.1	Rapports de fluorescence des sondes (CGH) dans la région 12qF2.	109
4.2	Rapports de fluorescence des sondes (CGH) dans la région 16qC3.3.	109
4.3	Remaniements chromosomiques chez les souris Ts1CJe.	110

Liste des tableaux

2.1	Classification des gènes portés par le chromosome 21.	16
2.2	Classification fonctionnelle des gènes portés par le chromosome 21.	17
3.1	Les modèles murins monogéniques.	29
7.1	Liste des amorces utilisées pour PCR quantitatives	65
1.1	Volumes moyens du cerveau et du cervelet chez les souris Ts1Cje adultes.	68
2.1	Paramétrisation de l'ANOVA.	79
2.2	Nombre de gènes différentiellement exprimés dans le cervelet.	84
2.3	Gènes différentiellement exprimés dans le cervelet.	87
2.4	Gènes en 3 copies régulés durant le développement et dans la trisomie.	90
3.1	Gènes significatifs après le FDR dans la couche externe à P0.	104
3.2	Gènes en 3 copies non significatifs après le FDR.	105
1.1	Rapports d'expression des gènes en 3 copies au cours du développement partie I.	145
1.2	Ratios d'expression des gènes en 3 copies au cours du développement partie II.	146
1.3	Ratios d'expression des gènes en 3 copies au cours du développement partie III.	147
2.1	Liste des principaux processus biologiques enrichis et déplétés dans le cervelet chez les souris Ts1Cje à P0.	149
2.2	Liste des principaux processus biologiques enrichis et déplétés dans le cervelet chez les souris Ts1Cje à P3.	150
2.3	Liste des principaux processus biologiques enrichis et déplétés dans le cervelet chez les souris Ts1Cje à P7.	151
2.4	Liste des principaux processus biologiques enrichis et déplétés dans le cervelet chez les souris Ts1Cje à P10.	152
2.5	Liste des principaux processus biologiques enrichis et déplétés dans l'EGL chez les souris Ts1Cje à P0.	153

Résumé

MODIFICATIONS DU TRANSCRIPTOME AU COURS DU DÉVELOPPEMENT POSTNATAL DU CERVELET DANS UN MODÈLE MURIN DE TRISOMIE 21.

La Trisomie 21, ou syndrome de Down, est causée par la présence d'une troisième copie du chromosome 21. De récentes analyses ont démontré une surexpression des gènes en 3 copies avec des effets de compensation ou d'amplification pour certains d'entre eux. Cependant, l'impact de l'effet de dosage génique sur l'ensemble du transcriptome est encore débattu.

C'est pourquoi nous avons mené une analyse de l'expression des gènes chez la souris Ts1Cje, un modèle murin de la Trisomie 21, au cours du développement postnatal du cervelet. En effet, nous avons montré dans ce modèle une diminution de la prolifération dans le cervelet à la naissance ainsi qu'une diminution du volume du cervelet chez l'adulte. L'analyse statistique de données de puces à ADN a révélé un effet majeur de dosage génique des gènes en 3 copie ainsi que de gènes présents sur un fragment délété de 2 Mb que nous avons pour la première fois caractérisé par hybridation génomique comparative. Cet effet de dosage génique n'influe que modérément sur le transcriptome : 2,4 à 7,5% des gènes exprimés sont régulés. De plus, nous n'avons trouvé que 13 gènes significativement régulés tout au long du développement postnatal du cervelet dont 6 correspondent à des gènes en 3 copies. Enfin, l'analyse de transcriptome à partir de dissections de la couche granulaire externe de cervelet, où nous avons démontré une réduction de la prolifération à la naissance, a révélé un effet majeur de dosage génique mais pas de déstabilisation globale du transcriptome.

Toutes ces données suggèrent qu'un nombre restreint de gènes présents en 3 copies sont responsables du phénotype présent dans le cervelet des souris Ts1Cje. Nous proposons une liste courte de gènes candidats.

Abstract

GENE EXPRESSION MODIFICATIONS DURING POSTNATAL CEREBELLUM DEVELOPMENT IN A MOUSE MODEL OF DOWN SYNDROME.

Down syndrome is a chromosomal disorder caused by the presence of three copies of chromosome 21. Recent studies have demonstrated increased transcript levels for the three-copy genes with some dosage compensation or amplification for a subset of them but the impact of this gene dosage effect on the whole transcriptome is still debated.

We thus designed a large scale gene expression study in the Ts1Cje Down syndrome mouse model in which we could measure the effects of trisomy 21 in the cerebellum that is affected in Down syndrome and where we could quantify the defects during postnatal development in order to correlate gene expression changes to the phenotype observed. Statistical analysis of microarray data revealed a major gene dosage effect : for the three-copy genes as well as for a 2Mb segment that we show for the first time as being deleted in the Ts1Cje mice using comparative genomic hybridization. This gene dosage effect impacts moderately on the expression of euploid genes (2.4 to 7.5% differentially expressed). Only 13 genes were significantly dysregulated in Ts1Cje mice across development and among them 6 are three-copy genes. Moreover, the decrease in granule cell proliferation that we demonstrated in newborn Ts1Cje cerebellum was correlated with a major gene dosage effect on the transcriptome but not a global destabilization of gene expression in dissected cerebellar external granule cell layer.

Altogether these results strongly suggest that the three-copy genes are directly responsible for the phenotype present in cerebellum. We provide a short list of candidate genes.

Introduction

Chapitre 1

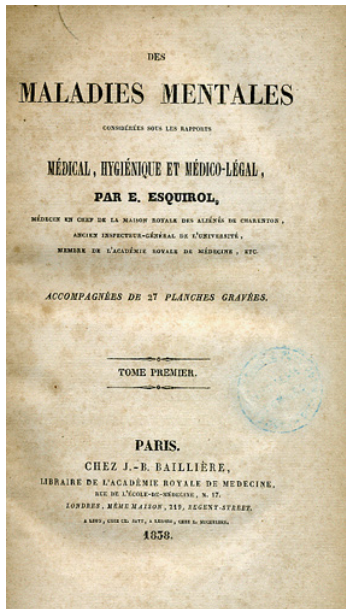
De la Trisomie 21

Sommaire

1.1	De l'idiotie à la Trisomie 21	3
1.2	Caractéristiques cliniques de la Trisomie 21	5
1.3	Épidémiologie, Étiologie et Mécanisme	12

La Trisomie 21, encore appelée syndrome de Down dans les pays anglo-saxons, est la plus fréquente des anomalies chromosomiques et la principale cause génétique de retard mental. Sa description clinique puis génétique se déroula parallèlement aux avancées scientifiques des XIXème et XXème siècles : depuis la description de plus en plus précise du phénotype jusqu'à la définition de ses bases génétiques pour aboutir à l'étude des relations entre génotype et phénotype.

1.1 De l'idiotie à la Trisomie 21



Jean Etienne ESQUIROL (1772-1840), premier, en 1817, à enseigner les maladies mentales à la Faculté de médecine et réformateur de la psychiatrie hospitalière française publia en 1838 « Des maladies mentales considérées sous le rapport médical, hygiénique et médico-légal », traité dans lequel il introduit une classification des diverses formes de folie. Il y décrit pour la première fois dans un chapitre consacré à l'idiotie, un enfant porteur de la Trisomie 21. Il y distingue également l'idiotie de la démence, qui jusqu'alors étaient confondus (Esquirol, 1838).

« L'idiotie n'est pas une maladie mais un état dans lequel les facultés intellectuelles ne se sont jamais manifestées. »

JE ESQUIROL

Décrite par le médecin psychiatre Edouard SEGUIN (1812-1880) en 1846 sous le nom d'idiotie furfuracée (Seguin, 1846) à cause de l'aspect de leur peau, le syndrome de la Trisomie 21 sera alors différencié du crétinisme, c'est à dire l'hypothyroïdie congénitale. Il donnera en 1866 une description plus précise du syndrome dans son traité « Idiocy and its treatment by the physiological method » (Seguin, 1866).

La même année, le psychiatre britannique John LANGDON-DOWN (1828-1896) publia « Observations on an Ethnic Classification of Idiots » dans lequel il caractérise un groupe de patients ayant des traits similaires au peuple mongole, à l'origine du vocable inapproprié "mongolisme" pour désigner la Trisomie 21. DOWN décrit le mongolisme comme une "régression raciale" causée par exemple par une dégénérescence due à la tuberculose chez les parents.

« There can be no doubt that these ethnic features are the result of degeneration. »

JLH DOWN

La définition du mongolisme de Down est directement inspirée de la théorie évolutionniste que DARWIN venait de publier en 1859 et sur une classification du genre humain en 5 races : Caucasiens, Malais, Amérindiens, Éthiopiens et Mongoliens proposée en 1795 par l'allemand BLUMENBACH s'inspirant lui même de la classification des races proposée par le français Carl LINNÉ. A cette époque se posait la question de savoir si les races humaines sont intrinsèquement différentes ou bien si elles témoignent de la diversité de l'espèce humaine. En s'appuyant sur l'exemple des mongoliens, DOWN conclura :

« I cannot but think that the observations which I have recorded, are indications that the differences in the races are not specific but variable. These examples of the result of degeneracy among mankind, appear to me to furnish some arguments in favour of the unity of the human species. » **JLH DOWN**

L'observation de DOWN est reprise par plusieurs auteurs dès les années 1870 et le terme de mongolisme est universellement accepté dès la fin du 19^e siècle. Son origine reste alors mystérieuse mais la liaison à l'âge maternel est déjà relevée conduisant à la théorie de l'épuisement utérin. D'autres facteurs seront proposés telles que l'alcoolisme, la syphilis, la position sociale, la consanguinité ou la race. Aucun lien entre ces facteurs et l'incidence de la Trisomie 21 n'a jamais été démontré

Il faudra attendre quasiment un siècle après la parution du traité d'ESQUIROL pour que l'origine génétique de la Trisomie 21 soit mise à jour. Entre temps, les bases de la cytogénétique seront posées : les chromosomes sont observés pour la première fois en 1842 par NÄGELI et la mitose décrite par FLEMMING en 1882. Les chromosomes furent ensuite reconnus comme support de l'hérédité au tournant du 20^e siècle après la redécouverte des travaux de MENDEL et la formulation du caryotype humain établie en 1956 par TIJO et LEVAN. Plusieurs auteurs émettront l'hypothèse d'une origine chromosomique du mongolisme mais aucun n'arrivera à l'établir.

C'est finalement en janvier 1959 que l'équipe française composée de Jérôme LEJEUNE, Marthe GAUTIER et Raymond TURPIN identifie les premiers l'origine génétique de la Trisomie 21 en établissant le caryotype de 3 enfants mongoliens : un chromosome sup-

plémentaire sur la 21^e paire de chromosomes est présent chez ces patients (Lejeune et al., 1959a; Lejeune et al., 1959b)(Figure 1.1). Ce fut le premier syndrome pour lequel on identifia une relation entre le génotype et le phénotype. Ils lui donnèrent le nom de « Trisomie 21 ».

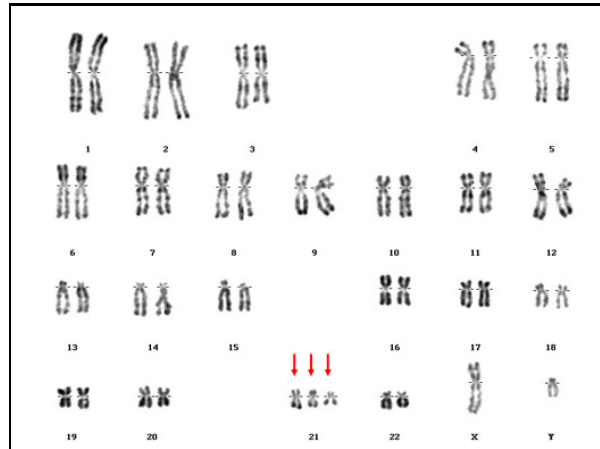


FIGURE 1.1: Caryotype d'un individu porteur de Trisomie 21.

1.2 Caractéristiques cliniques de la Trisomie 21

Les patients porteurs de Trisomie 21 présentent un large spectre de symptômes cliniques atteignant tous les systèmes tant au niveau structural que fonctionnel. Cependant la prévalence ainsi que la sévérité de ces symptômes sont très variables selon les individus. Certains, comme le retard mental, sont observés chez quasiment tous les patients, mais pour la grande majorité d'entre eux la Trisomie 21 constitue plutôt un facteur de risque. Aucun trait phénotypique de la Trisomie 21 ne lui est propre, ils sont tous présents dans la population générale mais à une prévalence plus faible. La figure 1.2 page 11 propose une synthèse de ces différents signes cliniques.

1.2.1 Caractéristiques craniofaciales et anomalies du squelette

Les caractéristiques physiques associées à la Trisomie 21 ont été les premières à être décrites. Dès la naissance, les individus porteurs de Trisomie 21 présentent un faciès caractéristique associé à une brachycéphalie (malformation du crâne) : le visage est rond et

plat, le crâne est plus petit et l'occiput aplati. Les fentes palpébrales sont obliques en haut et en dehors (yeux bridés) et associées à un épicanthus interne (repli de peau). L'iris peut présenter des tâches de couleur appelées taches de Brushfield. La nuque est courte, plate et large avec un excès de peau et les premières vertèbres cervicales présentent des malformations. La racine nasale est plate, le nez court et les narines antéversées. La bouche est petite et ouverte en permanence, les lèvres et la langue sont épaisses. Les oreilles sont petites et rondes avec un repli horizontal du bord supérieur du repli entourant le pavillon de l'oreille.

Les individus porteurs de Trisomie 21 se caractérisent également par un corps trapu, un bassin étroit, un abdomen distendu, parfois des scoliozes malformatives et des malformations des membres : des mains larges avec des doigts courts et ne présentant qu'une seule fissure transversale ainsi qu'une brachymésophalangie (raccourcissement de la deuxième phalange des doigts) et une clinodactylie (déviation latérale) du 5ème doigt, des pieds petits, larges et plats et présentant un écartement important des deux premiers orteils (Roubertoux and Kerdelhué, 2006; Delabar et al., 2006)

1.2.2 Cerveau, Cognition et Comportement

Le retard mental est le phénotype le plus marquant de la Trisomie 21. La grande majorité des patients présente un faible quotient intellectuel (QI) allant de modérément (70) à sévèrement retardé (30) (Vicari, 2004; Vicari, 2006). Contrairement à la population générale, leur QI décroît au cours de leur vie. Chez l'adulte, cela peut être dû à un vieillissement accéléré (Bush and Beail, 2004) et/ou à la forte prévalence de démence sénile de type Alzheimer observée dans cette population. De fait, à partir de 40 ans, les patients présentent les signes neuropathologiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer : plaques amyloïdes et dégénérescences neurofibrillaires. La sécrétion de protéine β -amyloïde commence dès l'enfance et se prolonge au cours du temps avec une accélération vers 35-45 ans (Lott and Head, 2005).

Les patients présentent des capacités normales dans l'accomplissement des tâches

simples mais présentent des difficultés dans les tâches faisant appel à la mémoire spatiale et la mémoire à long terme. Ils présentent également des difficultés dans l'acquisition de nouvelles compétences (Roubertoux and Kerdelhué, 2006; Vicari, 2006).

Les enfants porteurs de Trisomie 21 présentent un léger retard au cours des premiers stades de l'apprentissage de la motricité (rouler, s'asseoir). Ce retard s'accélère au cours du développement : les enfants porteurs de Trisomie 21 ne maîtrisant la marche qu'entre 15 et 74 mois contre 18 mois maximum dans la population générale (Vicari, 2006). Ce retard de développement s'accompagne d'une difficulté dans le maintien de la posture souvent attribuée à une hypotonie, fréquente chez les patients. Elle est associée à une laxité ligamentaire qui a comme conséquence une mobilité excessive des articulations. Mais d'autres études modèrent cette hypothèse et suggèrent l'existence de défaut dans les mécanismes de contrôle de la posture (Shumway-Cook and Woollacott, 1985; Roubertoux and Kerdelhué, 2006).

Les patients présentent souvent des problèmes de surdité ainsi que de faibles capacités linguistiques sans qu'aucune association n'ait pu être mise en évidence (Roizen et al., 1993). De plus, les enfants porteurs de Trisomie 21 présentent une plus grande fréquence de problèmes ophtalmologiques, le plus souvent du type myopie, hypermétropie ou astigmatisme, moins fréquemment du type strabisme ou opacité du cristallin (Caputo et al., 1989).

Les individus porteurs de Trisomie 21 peuvent présenter des troubles du comportement, surtout adaptatif (anxiété, dépression) ainsi que des défauts de l'attention et de l'activité motrice (hyperactivité), plus rarement des troubles autistiques ou des comportements agressifs. Ils peuvent également faire preuve d'une grande sociabilité et affectivité (Roizen and Patterson, 2003).

Au niveau anatomique, l'autopsie d'individus porteurs de Trisomie 21 a permis d'observer une diminution globale du poids du cerveau et particulièrement du cervelet ainsi que des lobes frontaux et temporaux (Wisniewski, 1990). Ces observations furent confir-

mées par la suite grâce à l'imagerie par résonance magnétique (IRM). On observe chez les patients une baisse du volume global du cerveau ainsi qu'une réduction disproportionnée du volume de différentes structures du cerveau impliquées dans l'apprentissage cognitif et moteur, en particulier l'hippocampe (situé dans le lobe temporal) et le cervelet. (Raz et al., 1995; Pinter et al., 2001). Au contraire, les noyau sous-corticaux tel le noyau lenticulaire ainsi que le cortex postérieur (pariétal et occipital) sont des structures particulièrement préservées (Pinter et al., 2001).

Certains auteurs ont avancé des hypothèses permettant d'expliquer le profil neuro-physiologique des patients au regard des défauts de structure de leur cerveau. Ainsi les faibles performances linguistiques pourraient être expliquées par une déstabilisation de la structure fronto-cérébelleuse impliquée dans l'articulation et la mémoire verbale (Fabbro et al., 2002) alors que les défauts de mémoire à long terme pourraient être la conséquence d'un dysfonctionnement de l'hippocampe (Pennington et al., 2003).

Au niveau cellulaire, plusieurs études ont rapporté une diminution du nombre de cellules dans certaines aires du cerveau, en particulier la couche corticale III, l'hippocampe et l'olive inférieure (Delabar et al., 2006) ainsi que dans le cervelet (Baxter et al., 2000). Il a également été observé une désorganisation des couches corticales associée à une arborisation axonale et dendritique anormale, plus dense chez le nouveau-né porteur de Trisomie 21. Puis cette densification de l'arborisation s'inverse à partir de 2 ans (Delabar et al., 2006).

1.2.3 Malformations viscérales

Malformations cardiaques

Des cardiopathies sont observées chez 40% à 50% des patients porteurs de Trisomie 21. Il s'agit de malformations congénitales pouvant entraîner la mort. Les anomalies les plus fréquemment observées concernent des défauts de cloisonnement entre les cavités inter-auriculaires (CIA) et inter-ventriculaires (CAV) pouvant aboutir à une déviation du

flux sanguin, la formation d'un canal atrio-ventriculaire (CAV), la persistance du canal artériel ou bien une tétralogie de Fallot. Dans 45% des cas, il s'agit d'une anomalie du septum atrio-ventriculaire et dans 35% des cas d'une anomalie du septum ventriculaire. (Freeman et al., 1998)

Troubles gastro-intestinaux

Les patients présentent une fréquence élevée d'anomalies gastro-intestinales. La maladie de Hirschsprung qui se traduit par une absence partielle ou totale de ganglions nerveux le long des intestins et notamment du colon est 50 fois plus fréquente dans la population porteuse de Trisomie 21 et le risque de sténose duodénale (rétrécissement du duodénum provoquant une constipation ou une occlusion intestinale) 300 fois plus élevé. La Trisomie 21 est également souvent associée à l'atrésie de l'œsophage, l'imperforation anale ou bien au pancréas annulaire (Delabar et al., 2006; Antonarakis et al., 2004; Dalla Vecchia et al., 1998).

1.2.4 Défaillance du système immunitaire

Les patients présentent une sensibilité accrue aux infections, particulièrement au niveau oto-rhino-laryngologique (oreille, nez et gorge) et présentent souvent des maladies de peau de type mycose. Pourtant aucune étude n'a rapporté d'immunodéficience sévère chez ces individus. La Trisomie 21 a cependant été associée à plusieurs anomalies du système immunitaire affectant à la fois la réponse humorale et la réponse à médiation cellulaire : des anomalies de la morphologie et du fonctionnement du thymus, des taux anormalement élevés des lymphocytes T (avec inversion du rapport CD4/CD8) et des lymphocytes NK ('natural killer') bien que l'activité des lymphocytes NK soit faible chez les patients. Au contraire le taux de lymphocytes B circulant est faible, l'expression de certaines cytokines (IL-2) est également diminuée, la sérologie présente des taux élevés en IgG et faibles en IgM.

Les individus porteurs de Trisomie 21 sont également plus fréquemment porteurs

d'hbsAg (Hepatitis B Surface Antigen), un indicateur de l'hépatite B et développent des anticorps dirigés contre le soi. Enfin, la fréquence des leucémies est 20 fois supérieure à celle de la population générale, ce sont surtout des leucémies aiguës lymphoblastiques (Ugazio et al., 1990; Roubertoux et al., 2005; Sérégaza et al., 2006).

1.2.5 Troubles hormonaux

Dès la naissance, les individus porteurs de Trisomie 21 présentent une taille inférieure aux normes. La taille finale moyenne est de 155 cm chez l'homme, 145 cm chez la femme. Aucun dysfonctionnement de la sécrétion d'hormone de croissance n'a été démontré. Certains patients présentent également une hypothyroïdie ou un diabète insulino-dépendant à des fréquences 4 à 100 fois supérieures à celle de la population générale.

Plus fréquemment est observée une surcharge pondérale, le plus souvent modérée. La puberté est normale mais retardée. Les femmes sont fertiles mais les hommes sont stériles. Enfin, ces individus sont soumis à un vieillissement prématuré, leur espérance de vie est de 55 ans avec un taux de mortalité augmenté dans les premiers mois de la vie.

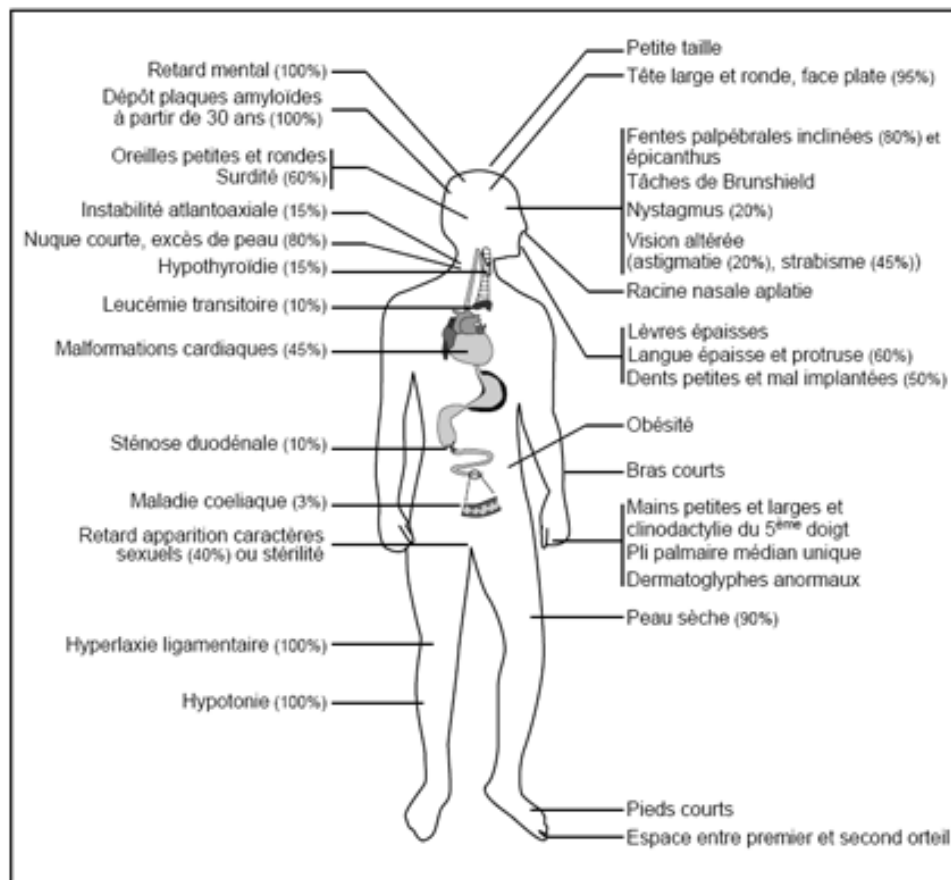


FIGURE 1.2: Schéma récapitulatif des principaux signes cliniques associés à la Trisomie 21.

1.3 Épidémiologie, Étiologie et Mécanisme

La Trisomie 21 est la cause de retard mental d'origine génétique la plus fréquente : environ 1 naissance sur 800. Cette fréquence est constante quel que soit le groupe ethnique ou socio-économique considéré mais le risque augmente avec l'âge maternel : 1 : 1400 entre 20-24 ans, 1 : 900 à 30 ans, 1 : 100 à 40 ans et 1 : 25 après 45 ans.

Un premier diagnostic peut être évoqué lors de l'examen échographique au 3^{ème} mois, devant l'existence d'une clarté nucale et de certaines malformations cardiaques. Un dosage sérique peut être également proposé afin de mesurer le taux de certains marqueurs, principalement la fraction libre de la β HCG (gonadotrophine chorionique humaine), de la PAPA (Pregnancy associated plasma protein A), de l'AFP (α -fétoprotéine) et de l'uE3 (unconjugated-estriol). Signes échographiques et dosages sériques associés à l'âge de la mère conduisent l'équipe médicale au calcul d'un risque statistique.

Cependant le diagnostic final ne peut se faire que par l'établissement du caryotype, nécessitant soit un prélèvement de trophoblaste soit une ponction de liquide amniotique pour examiner les cellules du fœtus. Cependant ces méthodes de prélèvement présentent des risques élevés de fausse couche.

A la naissance, le diagnostic clinique portera sur les anomalies caractéristiques du faciès (yeux bridés, épicanthus, nez petit et aplati à sa racine) et des membres (mains courtes et larges avec un pli palmaire unique). La confirmation du diagnostic passera toujours par l'établissement du caryotype.

Dans 92% des cas, la trisomie est dite libre, c'est à dire que le chromosome 21 complet est présent en 3 copies dans toutes les cellules de l'organisme. Mais dans 2 à 4% des cas, le chromosome 21 surnuméraire n'est pas présent dans toutes les cellules, on parle alors de trisomie en mosaïque. La proportion de cellules possédant un chromosome surnuméraire varie selon les tissus. Enfin dans 3 à 4% des cas il s'agit d'une translocation du chromosome 21 sur un autre chromosome (translocation robertsonienne).

Dans 90% des cas, l'origine du chromosome surnuméraire est maternelle. Elle est due à une non disjonction des chromosomes lors de la miéose.

Il existe actuellement des soins psychologiques ainsi que des traitements médicamenteux et chirurgicaux pour palier certains traits phénotypiques de la Trisomie 21, cependant aucun traitement n'est possible pour lutter contre les déficits intellectuels.

Chapitre 2

Du chromosome 21

Sommaire

2.1	Cartographie du Chromosome 21	14
2.2	Contenu génique du Chromosome 21	15
2.3	Le protéome du Chromosome 21	16
2.4	Comparaison de la séquence du chromosome 21	18

La Trisomie 21 étant due à la présence d'une copie surnuméraire du chromosome 21, son séquençage et l'analyse des gènes qu'il porte sont d'une grande importance afin de comprendre les mécanismes génétiques à l'origine du syndrome.

2.1 Cartographie du Chromosome 21

Le chromosome 21 (HSA21) est le plus petit des 23 chromosomes humains. C'est un chromosome acrocentrique représentant environ 1% du génome et dont la séquence quasi complète a été publiée en l'an 2000 (Hattori et al., 2000).

La carte physique du bras long du chromosome 21 a été établie par l'alignement de séquence d'une collection de 518 clones bactériens assemblés en 4 larges contigs entrecoupés par 3 fragments non séquencés de 30 à 40kb. Sa taille totale, comprenant 3 autres kb qui n'ont pu être séquencés, est de 33.65Mb. Enfin, 189 757 SNP (single nucleotide polymorphism) sont à ce jour dénombrés (Hattori et al., 2000, www.ensembl.org).

La séquence du bras court (21p), estimée entre 5 et 15 Mb, n'a à ce jour toujours pas

été déchiffrée à l'exception d'une courte séquence de 281kb (Hattori et al., 2000). Son séquençage est en cours au Sanger Center mais il est rendu difficile par la présence supposée de nombreux éléments répétitifs présentant un fort polymorphisme dans le nombre de répétitions (Antonarakis and Epstein, 2006).

2.2 Contenu génique du Chromosome 21

L'ensemble des gènes portés par le chromosome 21 n'est pas encore précisément connu. Selon les publications et les différentes bases de données, on estime à ce jour entre 271 et 386 le nombre de gènes codant pour des protéines situés sur le bras long du chromosome 21 (Antonarakis et al., 2004; Gardiner et al., 2003, Ensembl annotation database - www.ensembl.org, NCBI Reference Sequences - www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/). Il est cependant possible que ces prédictions, s'appuyant sur le séquençage d'EST (Expressed sequence tags), des comparaisons de séquences avec des régions orthologues chez la souris et des analyses *in silico* de la séquence du chromosome 21, en aient sous-estimé le nombre car les gènes constitués d'un seul exon ainsi que les ARN non codant sont particulièrement difficiles à identifier.

En 2004, une étude s'appuyant sur des expériences d'hybridation sur puce à ADN capables de détecter les régions transcriptionnellement actives avec une très grande résolution a mis en évidence l'existence de nombreuses unités de transcription localisées en dehors de toute région annotée (Kampa et al., 2004; Kapranov et al., 2002) suggérant que le nombre de gènes porté par le chromosome 21 puisse être dix fois plus important que les estimations actuelles (Antonarakis and Epstein, 2006). Il est donc prévisible que le catalogue des gènes portés par le chromosome 21 va s'enrichir au cours des prochaines années. A titre d'exemple, la table 2.1 présente les chiffres retenus par la base de donnée Ensembl lors de sa dernière mise à jour (version 49 - Mars 2008).

Le chromosome 21 contient peu de gènes, environ 2 fois moins que le chromosome 22 de taille comparable. De plus, les gènes portés par le chromosome 21 semblent plutôt

Known Protein-coding Genes	283
Novel Protein-coding Genes	16
Pseudogene Genes	26
mRNA Genes	10
rRNA Genes	3
snRNA Genes	11
snoRNA Genes	7
misc RNA Genes	8

TABLE 2.1: Classification des gènes portés par le chromosome 21. Abréviations = mRNA : micro-RNA, rRNA : ribosomal-RNA, snRNA : small nuclear-RNA, snoRNA : small nucleolar-RNA, misc : miscallaneous. (www.ensembl.org).

être des modulateurs d'autres gènes et/ou protéines plus que des gènes principaux ayant un rôle clef dans un processus donné. Cela expliquerait pourquoi la Trisomie 21 est viable (Ma'ayan et al., 2006).

Enfin, l'étude d'individus porteurs de Trisomie 21 partielle a permis d'isoler une portion du chromosome 21 humain contenant 33 gènes potentiellement responsables de nombreux signes phénotypiques dont les dysmorphies craniofaciales, la petite taille, l'hyperlaxité des ligaments, l'hypotonie ainsi que le retard mental. Cette région s'étend sur environ 5Mb depuis *D21S17* à *MX1* sur la bande 21q22.3 et a été appelée 'DSCR' pour Down Syndrome Critical Region (Delabar et al., 1993; Korenberg et al., 1994).

2.3 Le protéome du Chromosome 21

Le chromosome 21 contient près de 300 gènes codant pour des protéines dont on ne connaît pas encore pour toutes leur fonction. L'analyse ontologique des gènes du chromosome 21 indique qu'ils interviennent dans plusieurs dizaines de fonctions biologiques (environ une centaine). Environ une quinzaine de gènes est référencée comme codant pour des facteurs de transcriptions ou des molécules de liaison à l'ADN et 11 gènes sont impliqués dans la transduction du signal. En 2000, Gardiner et al. ont publiés une liste des gènes portés par le chromosome 21 dont au moins une fonction était connue ou supposée. La table 2.2 reproduit en partie ce document :

Functional categories	Number of genes	Functional assignments
Transcription factors, regulators and modulators	17	GABPA, BACH1, RUNX1, SIM2, ERG, ETS2, ZNF294, ZNF295, Pred65, ZNF298, APECED, GCFC, KIAA0136, SON, PKNOX1, HSF2BP, NRIP1.
Chromatin structure	4	H2BFS, HMG14, CHAF1B, PCNT.
Proteases and protease inhibitors	6	BACE, TMPRSS2, TMPRSS3, ADAMTS1, ADAMTS5, CSTB.
Ubiquitin pathway	4	USP25, USP16, UBE2G2, SMT3A.
Interferons and immune response	9	IFNAR1, IFNAR2, IL10RB, MX1, MX2, IFNGR2, CCT8, TIAM1, TCP10L.
Kinases	8	ENK, MAKV, MNB, KID2, PHK, PFKL, ANKRD3, PRKCBP2.
Phosphatases	2	SYNJ1, PDE9A.
RNA processing	5	rA4, U2AF35, RED1, PCBP3, RBM11.
Adhesion molecules	4	NCAM2, DSCAM, ITGB2, c21orf43.
Channels	7	GRIK1, KCNE1, KCNE2, KNCJ6, KCNJ15, CLIC11, TRPC7.
Receptors	5	CXADR, Claudins 8, 14, 17, Pred12.
Transporters	2	SLC5A3, ABCG1.
Energy metabolism	4	ATP50, ATP5A, NDUFV3, CRYZL1.
Structural	4	CRYA, COL18, COL6A1, COL6A2.
Methyl transferases	3	DNMT3L, HRMTIII, Pred28.
SH3 domain	3	ITSN, SH3BGR, UBASH3A.
One carbon metabolism	4	GART, CBS, FTCD, SLC19A1.
Oxygen metabolism	3	SOD1, CBR1, CBR3.

TABLE 2.2: Classification fonctionnelle des gènes portés par le chromosome 21. (Gardiner and Davisson, 2000)

2.4 Comparaison de la séquence du chromosome 21

Le décodage de la séquence du chromosome 21 a permis de la comparer avec le génome de la Souris afin de déterminer des régions orthologues supposées fonctionnelles. De fait il existe une forte homologie de séquence entre le chromosome 21 humain et les chromosomes 16, 17 et 10 chez la Souris (représentés sur la figure 2.1). On dénombre près de 3500 séquences d'une taille supérieure à 100 pb présentant plus de 70% d'homologie. Parmi celles-ci, seules environ $\frac{1}{3}$ sont localisées dans les régions exoniques des gènes déjà identifiés. Les autres séquences correspondent à des régions pauvres en gène (régions intergéniques) ou bien à des régions introniques, suggérant un rôle encore inconnu à ces régions "non fonctionnellement codantes".

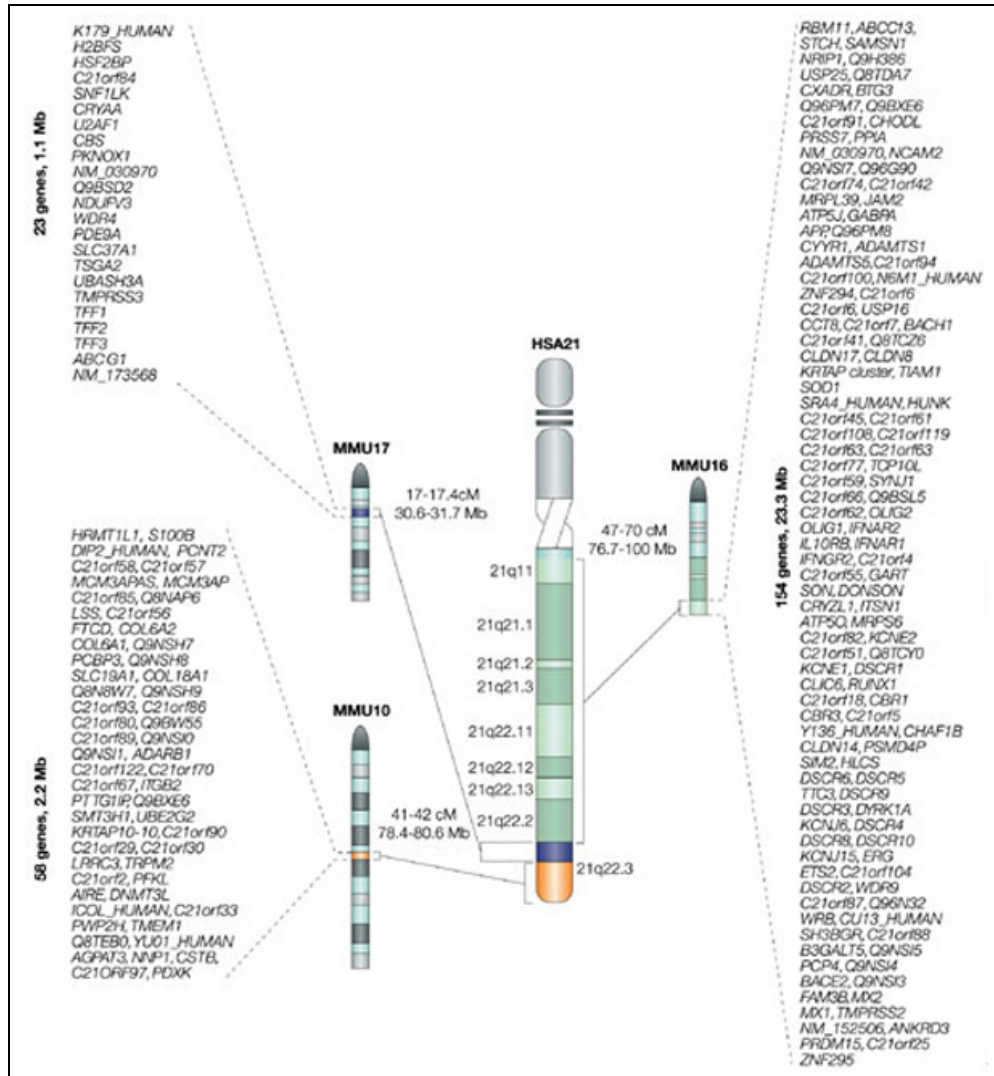


FIGURE 2.1: Régions synténiques entre le chromosome 21 humain (Hsa21) et les chromosomes murins (Mmu) 10, 16 et 17 (Antonarakis et al., 2004)

Chapitre 3

Des modèles d'étude de la Trisomie 21

Sommaire

3.1	Les modèles de trisomie partielle	21
3.2	Les modèles trans-chromosomiques	26
3.3	Les modèles murins monogéniques	28
3.4	Limitations des modèles murins	30

Les premiers gènes identifiés sur le chromosome 21 humain (Hsa21) furent *Sod1* et *Ifnar1* en 1973 (Tan et al., 1973). Ces 2 gènes codent respectivement pour la CuZn super-oxide dismutase et pour la sous-unité de liaison au récepteur à l'interféron α . Par la suite, il fut montré que des fibroblastes de patients porteurs de Trisomie 21 étaient capables de lier près de 50% d'interféron en plus que des cellules d'individus contrôles. L'effet inverse fut également observé dans des cellules ne contenant qu'une seule copie du chromosome 21. (Epstein et al., 1982). Du point de vue fonctionnel, une sensibilité accrue des fibroblastes et des monocytes issus de patients porteurs de Trisomie 21 fut également rapportée (Epstein and Epstein, 1976; Epstein et al., 1980). Ces expériences ont montré que la présence en 3 copies d'un gène pouvait aboutir à une augmentation de la quantité de protéine produite ainsi qu'à une modulation fonctionnelle dans la cellule.

Ces premières études furent conduites sur du matériel humain : cellules de peau et cellules sanguines. La nécessité de disposer d'une plus grande diversité de tissus et notamment de pouvoir accéder au système nerveux central ainsi que la forte synténie entre le chromosome 21 humain et le chromosome 16 murin ont motivé et permis la création

de modèles animaux. Pour plus de clarté ces différents modèles sont schématisés à la fin de ce chapitre dans la figure 3.2 page 27.

3.1 Les modèles de trisomie partielle

3.1.1 Ts16

En 1975, suite à la localisation de *Sod1* et *Ifnar1* sur le chromosome 16 murin (Mmu16), une souris trisomique pour ce chromosome (Ts16) apparut comme un modèle potentiel de la Trisomie 21 (Gropp et al., 1974). De fait, nous savons aujourd'hui que le chromosome Mmu16 est synténique pour approximativement 80% des gènes et prédictions de gènes portés par le bras long du chromosome Hsa21.

Du point de vue phénotypique, ce modèle est intéressant car il présente des anomalies cardiaques ainsi qu'une hypoplasie du thymus, un retard de la maturation du système immunitaire et des malformations faciales (Epstein et al., 1985; Berger and Epstein, 1989; Epstein, 2002). Mais ces souris présentent 2 grands défauts :

1. Elles ne sont pas viables, les nouveau-nés ne survivent pas à la naissance, limitant leur étude au stade embryonnaire.
2. Le chromosome 16 de la Souris contient 715 gènes codant pour des protéines (www.ensembl.org - release 49) dont la majeure partie n'est pas orthologue au chromosome 21 humain (Sérégaza et al., 2006).

3.1.2 Ts65Dn

Au début des années 1990 le Jackson Laboratory mis au point une lignée trisomique 16 partielle. Cette souris baptisée Ts65Dn possède une troisième copie de la partie distale du chromosome 16 transloquée sur le chromosome 17. La souris Ts65Dn est trisomique pour environ 132 gènes, tous orthologues au chromosome 21 humain, depuis *Mrpl139* jusqu'à *Znf295* (Reeves et al., 1995; Akeson et al., 2001; Sérégaza et al., 2006; Baxter et al., 2000; Davisson et al., 1990; Davisson et al., 1993).

Les souris Ts65Dn sont viables et ne présentent pas de malformation congénitale importante (en particulier cardiaque). Comme dans la Trisomie 21, les mâles sont stériles. Avec quelques difficultés, il est possible d'élever une colonie en utilisant des femelles trisomiques sur un fond mixte (Epstein, 2002).

Ces souris développent des traits phénotypiques communs avec la Trisomie 21 : elles sont plus petites et deviennent obèses vers 4-5 mois (Kola and Hertzog, 1998). Elles présentent des anomalies craniofaciales comparables à celles observées chez les individus porteurs de Trisomie 21 (Richtsmeier et al., 2000), des troubles de l'apprentissage et de la mémoire ainsi que des signes d'hyperactivité (Reeves et al., 1995). On observe parfois des hydrocéphalies ainsi que des tremblements et des crises d'épilepsie chez les souris âgées. Les neurones cholinergiques du proencéphale basal subissent un processus neurodégénératif associé à une diminution du transport rétrograde du NGF (Nerve growth factor) (Holtzman et al., 1996; Salehi et al., 2006) mais aucun signe clinique ne suggère une pathologie du type Alzheimer avant 21 mois bien que la protéine amyloïde soit présente à des taux élevés dans le cerveau (Reeves et al., 1995; Costa et al., 1999; Galdzicki and Siarey, 2003; Salehi et al., 2006). Ces souris présentent une hypoplasie cérébelleuse associée à une réduction de la densité des cellules granulaires (Baxter et al., 2000). L'hippocampe présente une densité neuronale anormalement élevée dans la zone CA3 et réduite au niveau du gyrus denté (Insausti et al., 1998; Kurt et al., 2004) ainsi qu'une diminution de la production d'AMP cyclique dans l'hippocampe (Dierssen et al., 1996). La plasticité synaptique mesurée dans l'hippocampe est également anormale : chez les souris Ts65Dn la LTP (long term potentiation) est plus faible alors que la LTD (long term depression) est plus forte (Galdzicki and Siarey, 2003). De plus les épines dendritiques au niveau du gyrus denté et de la zone CA1 de l'hippocampe présentent une morphologie anormale (Belichenko et al., 2007). Enfin au niveau du cortex temporal il a été observé une diminution de 30% du nombre de synapses excitatrices (Kurt et al., 2000; Kurt et al., 2004).

A ce jour, cette lignée est le modèle le plus utilisé.

3.1.3 Ts1Cje

Le clonage du gène *Sod1* permet de créer une nouvelle lignée surexprimant uniquement un seul des gènes de la Trisomie 21 (Epstein et al., 1987; Groner, 1995). C'est en tentant de générer une souris privée de ce gène, que la souris Ts1Cje fut obtenue par hasard. Cette nouvelle lignée trisomique partielle est issue d'une translocation réciproque entre le télomère du chromosome 12 et la partie distale du chromosome 16 au niveau de *Sod1*. La souris Ts1Cje est trisomique pour environ 85 gènes, de *Sod1* à *Znf95*. Cependant la troisième copie de *Sod1* n'est pas fonctionnelle car elle est interrompue par une cassette de résistance à la Néomycine (Sago et al., 1998; Sago et al., 2000).

Lorsque l'on compare ces souris aux souris Ts65Dn, les souris Ts1Cje présentent les mêmes déficits lors des tests de comportement mais de façon moins prononcée et montrent des signes d'hypo-activité (Sago et al., 1998; Sago et al., 2000). La diminution du nombre d'épines dendritiques, leur élargissement ainsi que les anomalies de la LTP sont également observés chez les souris Ts1Cje mais moins sévèrement (Belichenko et al., 2007). Par contre, les souris Ts1Cje ne présentent pas de dégénérescence des neurones cholinergiques et le transport rétrograde du NGF est meilleur que chez les souris Ts65Dn (Salehi et al., 2007).

La lignée Ts1Cje présente de grands avantages :

1. Contrairement à la lignée Ts65Dn, les souris Ts1Cje ne présentent pas de problèmes de fertilité. Il est donc plus facile d'obtenir des portées et d'entretenir une colonie.
2. Les souris Ts1Cje présentent un grand nombre de phénotypes communs avec la lignée Ts65Dn mais ne sont trisomiques que pour environ $\frac{2}{3}$ des gènes en 3 copies chez les souris Ts65Dn, réduisant ainsi le nombre de gènes candidats.
3. Comme les souris Ts65Dn, les souris Ts1Cje sont trisomiques pour les gènes de la DSCR.

C'est pourquoi la lignée Ts1Cje (figure 3.1) a été choisie pour conduire l'étude que j'ai menée durant mon doctorat. Tous les résultats présentés dans ce manuscrit ont été tirés

d'expériences menées avec ce modèle. Ces souris nous ont été fournies par Yann Héroult, responsable scientifique de l'Institut de Transgénèse à Orléans dans le cadre du programme européen 'anEUploidy' (www.aneuploidy.eu).



FIGURE 3.1: La souris Ts1Cje. Visuellement, les souris Ts1Cje sont indistingables des souris contrôles.

3.1.4 Ms1/Ts65Dn

Un quatrième modèle d'aneuploidie, la souris Ms1/Ts65Dn, contient une troisième copie du segment du chromosome 16, du gène *App* au gène *Sod1*, c'est à dire le segment présent en 3 copies chez les souris Ts65Dn mais en 2 copies seulement chez les souris Ts1Cje. Cette souris est trisomique pour environ 46 gènes.

Lors de test du comportement (Morris water maze), les souris Ms1/Ts65Dn ont montré de meilleures performances par rapport aux souris Ts65Dn et Ts1Cje et n'ont montré aucun signe d'hypo- ou d'hyperactivité (Sago et al., 2000). D'autre part, aucune réduction du volume du cervelet n'a pu être observée, même si ces souris présentent une diminution de la densité des cellules granulaires et des cellules de Purkinje au niveau du cervelet, du même ordre que les souris Ts1Cje (Olson et al., 2004).

3.1.5 Ts1Rhr et Ms1Rhr/Ts65Dn

La souris Ts1Rhr est trisomique uniquement pour un segment du chromosome 16 situé entre les gènes *Cbr3* et *Mx2*, correspondant à la DSCR (chapitre 2.2 page 16). Elle a été générée en utilisant le système Cre/LoxP afin de tester si la triplication de la DSCR est capable d'engendrer seule les anomalies observées dans les modèles Ts65Dn et Ts1Cje ainsi que chez les individus porteurs de Trisomie 21.

L'analyse de ce modèle a montré que la trisomie de la DSCR n'est pas suffisante pour engendrer les phénotypes précédemment observés tels que la courte stature, la réduction de la mandibule ou bien les anomalies craniofaciales (Olson et al., 2004; Olson et al., 2007). Seule une réduction significative du volume du cervelet de l'ordre de 5% est observée (Olson et al., 2007; Aldridge et al., 2007). Cependant, contrairement à ce qui est rapporté par Olson et al. (2004, 2007), l'équipe du Pr. William Mobley (Stanford university, USA) observe des différences lors de tests du comportement ainsi que des modifications de la LTP (communication personnelle, Paris le 29 Avril 2008).

Ces modifications n'ont également pas été retrouvées dans la souris Ms1Rhr/Ts65Dn qui est disomique pour les gènes de la DSCR. Pour Olson et al. (2007) cela semble signifier que des gènes situés dans la DSCR participent aux défauts du comportement liés à l'hippocampe dans les souris Ts65Dn mais n'agissent qu'en interaction avec d'autres gènes en 3 copies. Les résultats évoqués par W. Mobley suggèrent une certaine réserve quand à cette conclusion et invitent à une analyse plus poussée et minutieuse de ces modèles.

3.1.6 Ts1Yah et Ts2Yah

Les modèles Ts1Yah et Ts2Yah sont trisomiques pour des régions homologues au chromosome 21 humain situées sur les chromosomes 17 et 16 de la Souris. Ils ont récemment été mis au point par Yann Herval au centre de transgénèse à Orléans. Une étude volumétrique par IRM n'a décelé aucune modification du volume du cervelet, du thala-

mus et de l'hypothalamus (Données non publiées - Présentation poster lors du congrès du GRAMM à Lyon les 26,27,28 mars 2008). Cela semble suggérer que le ou les gènes responsables de l'hypoplasie cérébelleuse ne sont pas situés dans ces régions. La génération et l'analyse d'autres modèles murins ne surexprimant qu'une partie des gènes homologues situés sur le chromosome 16 ainsi que les gènes homologues portés par le chromosome 10 est en cours. Le croisement de souris Ts65Dn et de souris trisomiques pour les gènes homologues au chromosome 21 humain portés par les chromosomes 10 et 17 de la Souris permettront la mise au point d'un modèle murin trisomique pour tous les gènes murins homologues aux gènes du chromosome 21 humain.

3.2 Les modèles trans-chromosomiques

3.2.1 Tc1

Un modèle transchromosomique a été mis au point par l'insertion d'une copie quasi-intégrale du chromosome 21 humain dans des cellules souches embryonnaires de souris. La souris Tc1 est trisomique pour 92% des gènes portés par HSA21. Les souris sont viables et ne présentent pas de défauts majeurs. Des anomalies cardiaques sont observées dans 75% des fœtus. Aucune anomalie du squelette n'a pu être mise en évidence si ce n'est une mandibule plus courte. Par contre, ces souris présentent une diminution de la densité des cellules granulaires au niveau de l'hippocampe ainsi que des déficits cognitifs lors de tests de comportement impliquant l'hippocampe et associés à une diminution de la LTP au niveau du gyrus denté. Comme dans les autres modèles de la Trisomie 21 ainsi que dans les souris transgénique surexprimant spécifiquement l'APP, aucun signe d'histopathologie de type Alzheimer n'a été observé chez ces souris. Cependant la souris Tc1 présente un haut degré de mosaïcisme : par exemple seul $\frac{1}{3}$ des cellules dans le cerveau porte le chromosome 21 humain et ce taux est variable en fonction des tissus. Enfin, il existe toujours un doute sur l'origine de chaque phénotype observé dans ce modèle : sont-ils dus à la présence de gènes en 3 copies ou bien au grand nombre de protéines humaines

exprimées dans un organisme murin ? (O'Doherty et al., 2005; Salehi et al., 2007).

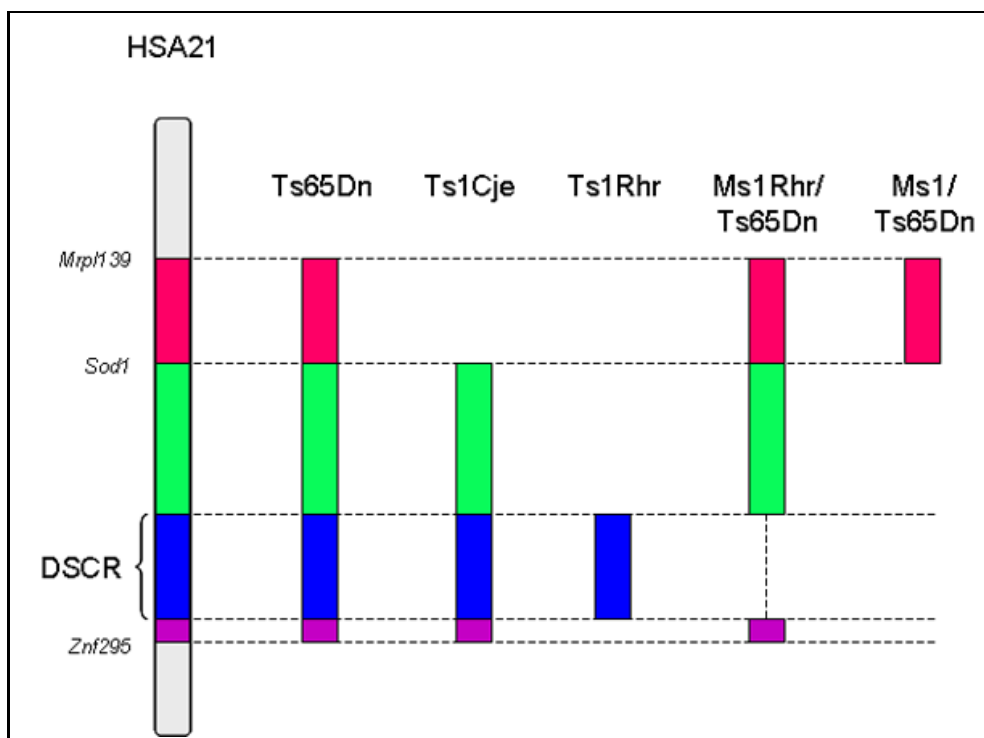


FIGURE 3.2: Comparaison entre les différents modèles murins de la Trisomie 21

3.3 Les modèles murins monogéniques

Des modèles monogéniques, ne surexprimant qu'un ou quelques gènes présents en 3 copies chez les individus porteurs de Trisomie 21 ont été également générés. Selon les modèles, la version du gène inséré est soit le gène murin soit le gène humain. Plusieurs de ces modèles développent des traits phénotypiques dans les modèles d'aneuploidie précédents et dans la Trisomie 21. Les principaux modèles monogéniques sont synthétisés dans le tableau 3.1. Ces modèles ne sont intéressants que dans la mesure où un gène est capable d'induire seul un phénotype mais ils ne permettent pas de tenir compte des interactions possibles entre des gènes participant à des voies communes.

Modèle	Phénotype	Références
TgSOD1	Hypoplasie du thymus, langue épaisse, anomalie de la jonction neuromusculaire, déficience de l'apprentissage, défaut de LTP dans l'hippocampe, anomalie au niveau des mitochondries, apoptose au niveau du thymus et système nerveux.	Gahtan et al., 1998; Jaarsma et al., 2000.
TgPFKL	Anomalies du métabolisme du glucose.	Peled-Kamar et al., 1998
TgS100β	Astrocytose, déficience de la mémoire spatiale, développement dendritique anormal.	Reeves et al., 1994
TgAPP	Activité locomotrice accrue, défauts dans l'apprentissage et la mémoire, diminution du transport rétrograde du NGF.	Lamb et al., 1993; Salehi et al., 2006; Harris-Cerruti et al., 2004
TgEts2	Dysmorphies craniofaciales, brachycéphalie, nuque courte, apoptose liée à l'induction de P53.	Sumarsono et al., 1996; Wolvetang et al., 2003
TgHMG14	Kystes au niveau du thymus.	Bustin et al., 1995
TgCBS	Diminution du taux d'homocystéine.	Wang et al., 2004
TgRcan1	Diminution de l'activité de la calcineurine	Chang et al., 2003
TgDyrk1a	défauts de la locomotion et de la mémoire spatiale	Altafaj et al., 2001
TgDYRK1A	Altération de la plasticité synaptique dans l'hippocampe	Ahn et al., 2006
TgSim2	Déficience de l'apprentissage spatial, anxiété	Ema et al., 1999; Chrast et al., 2000

TABLE 3.1: Les modèles murins monogéniques. Les transgènes humains sont notés en majuscule, les transgènes murins en minuscule. Revue dans Kola and Hertzog, 1998; Kola and Pritchard, 1999; Salehi et al., 2007

3.4 Limitations des modèles murins

La reproduction d'une partie du phénotype de la Trisomie 21 chez la Souris montre à quel point ces modèles constituent un outil précieux et puissant pour le chercheur. Cependant, certaines limites de ces modèles ne doivent pas être oubliées :

1. Le modèle de Trisomie 21 partielle le plus complet (Ts65Dn) n'est trisomique que pour environ 50% des gènes portés par le chromosome 21 humain et le chromosome 21 humain présent en mosaïque dans la lignée Tc1 n'est complet qu'à environ 92%.
2. Le chromosome 21 humain doit certainement contenir des séquences de régulation absentes ou différentes sur le chromosome 16 murin. Et dans le cas des modèles transchromosomiques, il est possible que des séquences propres au chromosome 21 humain ne soient pas lues ou correctement interprétées par la machinerie transcriptionnelle de la souris.
3. Il est possible que les patrons d'expression de certains gènes ne soient pas les mêmes chez l'Homme et la Souris, aussi bien dans l'espace que dans le temps.
4. Les fonctions spécifiques de certains gènes, même orthologues, peuvent être différentes selon les organismes.

Chapitre 4

Des modifications de l'expression des gènes dans la Trisomie 21

Sommaire

4.1	Les puces à ADN	31
4.2	L'effet du dosage génique	34
4.3	Quelles conséquences sur le transcriptome ?	38
4.4	'Effet de dosage génique' ou 'rupture de l'homéostasie' ?	39

Parce que ce qui caractérise les personnes porteuses de Trisomie 21 est la présence d'une troisième copie du chromosome 21, de nombreuses équipes ont analysé l'expression des gènes chez les individus porteurs de Trisomie 21 afin de caractériser :

1. Les modifications de l'expression des gènes en 3 copies,
2. Les conséquences de ces modifications sur l'expression de l'ensemble du génome.

4.1 Les puces à ADN

La technologie des puces à ADN a été mise au point au début des années 1990 (Fodor et al., 1991) et a été largement utilisée ces dix dernières années. Elle permet en effet d'analyser l'expression de milliers de gènes en parallèle dans un échantillon, ce qui revient à faire des milliers de Northern Blots en parallèle.

En générale une puce à ADN ('microarray' ou 'gene chip' en anglais) se présente sous la forme d'une lame de verre de format comparable aux lames de verre utilisées en his-

tologie sur laquelle ont été déposées par un robot des milliers de micro-gouttes contenant des séquences d'oligonucléotides connues appelées 'sondes'. Ces sondes ont été dessinées par un logiciel pour garantir une complémentarité spécifique avec les séquences d'ADN (i.e. gènes) référencées dans les bases de données.

Un échantillon d'ARN, converti en ADN ou en ARN complémentaires et marqué avec un fluorophore est alors hybridé sur la puce. Ces molécules marquées sont appelées 'cibles'. Les molécules présentes dans l'échantillon vont alors s'hybrider de façon spécifique avec les sondes présentes sur la puce. Après lavage, on recueille à l'aide un scanner la fluorescence émise par chaque sonde. L'intensité du signal est proportionnelle au nombre de molécules fluorescentes hybridées et donc à la quantité d'ARN présente initialement dans les cellules de l'échantillon.

En fait il existe plusieurs types de puces à ADN. Les différences portent essentiellement sur le support (silice, lame de verre, micro-billes, membrane de nylon), le mode de détection des cibles (fluorescence, chemoluminescence, radioactivité), le type des sondes (produits PCR, oligonucléotides courts ou longs) qui peuvent être soit déposées sur la lame ou bien synthétisées *in situ*, le type des cibles (ADN, ADNc, ARNc) et le nombre d'échantillons hybridés sur chaque lame (puces mono ou 2-couleurs).

Durant ma thèse, j'ai utilisé 3 types de puces à ADN :

Les puces du RNG/MRC. Ce sont des lames de verre sur lesquelles sont déposées environ 25 000 sondes couvrant l'ensemble du génome murin (Le Brigand et al., 2006). Deux échantillons, l'un marqué avec de la Cy3 et l'autre avec de la Cy5 sont hybridés sur une puce. Les niveaux de fluorescence sont recueillis à chaque longueur d'onde spécifique des 2 fluorophores : 550nm pour la Cy3 et 650nm pour la Cy5. Dans mes expériences, j'ai toujours hybridé un échantillon trisomique avec un échantillon contrôle. Ainsi, le ratio des niveaux de fluorescence de chaque sonde est proportionnel au ratio d'expression de chaque gène dans les individus trisomiques par rapport aux individus contrôles. Cette technique permet de comparer 2 échantillons sur une seule lame et d'éviter ainsi des biais dus aux manipulations. La

figure 4.1 schématise le principe de la technologie des puces à ADN appliqué à ce type de puce.

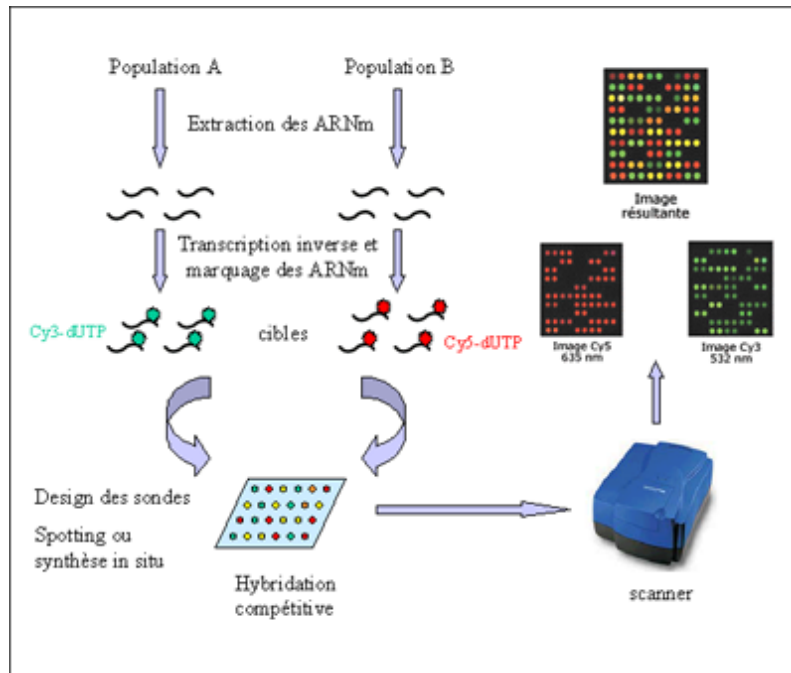


FIGURE 4.1: Principe des puces à ADN - 2 échantillons marqués par 2 fluorophores sont hybridés sur la puce. Le ratio des intensités correspond aux ratios d'expression des gènes entre les 2 échantillons.

Les puces Illumina. Illumina est une société américaine basée à San Diego qui a mis au point des puces à ADN basées sur la technologie 'BeadArray' inventée par le Dr. David Walt, professeur de chimie à l'université de Tufts (Boston, USA) en 1998. Les cibles marquées avec de la Cy3 sont hybridées sur des billes sur lesquelles sont attachées des sondes spécifiques. Chaque sonde est représentée de nombreuses fois pour augmenter la précision (figure 4.2). Les puces que nous avons utilisées contiennent environ 45 000 sondes différentes couvrant l'ensemble du génome murin. Un seul échantillon marqué par la Cy3 est hybridé sur chaque puce. Par contre, 6 puces sont contenues sur chaque lame, ce qui permet d'analyser en parallèle 6 échantillons.

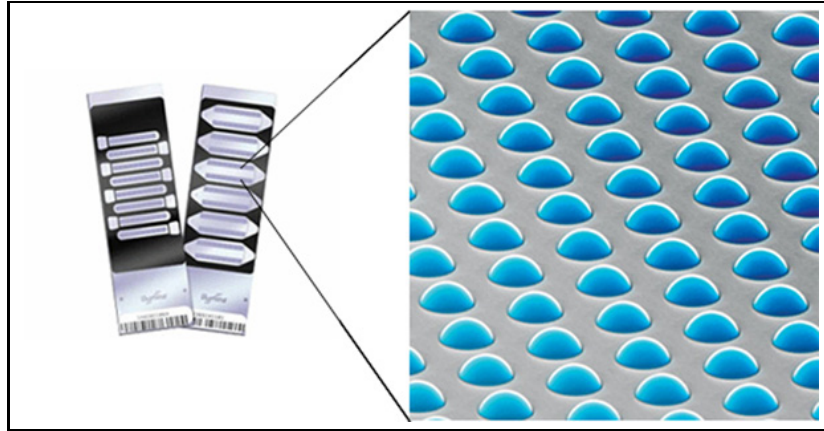


FIGURE 4.2: Principe des puces Illumina : des billes sur lesquelles sont attachées les sondes sont dispersées aléatoirement sur une lame.

Les puces CGH Agilent. Les puces CGH (Comparative Genomic Hybridization) ne servent pas à mesurer le taux de transcrits dans un échantillon mais la quantité relative d'ADN génomique entre 2 échantillons. Ce ne sont pas des ARNm retro-transcrits mais de l'ADN génomique provenant des 2 individus à comparer qui est fragmenté et marqué avec un fluorophore (Cy3 pour l'un et Cy5 pour l'autre) qui est hybridé. Ces puces, contenant environ 235 000 sondes spécifiques réparties sur tout le génome murin, permet d'établir le profil de variation du nombre de copies des séquences géniques avec une résolution moyenne de 6,4kb. Elles sont souvent utilisées en cancérologie afin de détecter des remaniements chromosomiques de type amplification ou délétion.

4.2 L'effet du dosage génique

Suite au développement récent des méthodes d'analyses du transcriptome à haut débit, principalement les puces à ADN, ces dernières années plusieurs études sur le transcriptome dans la Trisomie 21 sont parues.

En 2000, Fitzpatrick et al. ont comparé le transcriptome de pools de cellules humaines de fœtus porteurs ou non de Trisomie 21 en utilisant des puces à ADN 2-couleurs (figure 4.1) capables de détecter l'expression d'environ 9000 gènes. Dans cette étude, l'ex-

pression des gènes du chromosome 21 présentait un rapport d'expression moyen de 1,1 entre les échantillons trisomiques et les échantillons contrôles et la majorité des gènes les plus fortement dérégulés est localisée sur les autres chromosomes suggérant qu'une faible surexpression des gènes en 3 copies pouvait être à l'origine d'une modification de l'expression de gènes à travers le génome. Les auteurs avaient alors supposé que la gravité des symptômes dépendrait du nombre de gènes dérégulés et de leur degré de dérégulation (FitzPatrick et al., 2002).

Par la suite d'autres études ont confirmé une augmentation globale de l'expression des gènes en 3 copies chez les patients porteurs de Trisomie ainsi que dans des modèles de Trisomie partielle chez la Souris. En 2003, Mao et al. ont rapporté une augmentation globale spécifique des gènes du chromosome 21 dans des échantillons de cortex cérébral ainsi que dans des lignées astrocytaires issues de fœtus humains porteurs de Trisomie 21 en utilisant des puces à ADN Affymetrix capables de détecter l'expression d'environ 20 000 gènes humains (Mao et al., 2003). En 2005, cette équipe confirma ses résultats sur des échantillons de cervelet et de cœur issus de fœtus humains (Mao et al., 2005). Leurs résultats suggèrent une dérégulation des gènes en 3 copies spécifique selon les tissus. Plus récemment, l'analyse du transcriptome (puces Affymetrix, 14 500 sondes) d'échantillons *post-mortem* prélevés chez des patients adultes porteurs de Trisomie 21 et des individus contrôles a montré que seuls 25% des gènes en 3 copies sont surexprimés (Lockstone et al., 2007).

Chez la souris Ts65Dn, l'expression des gènes en 3 copies a été analysée dans 9 tissus (poumon, muscle squelettique, mésencéphale, cervelet, cortex, foie, testicules, cœur et reins) sur des puces à ADN en nylon contenant des sondes spécifiques pour 136 gènes orthologues au chromosome 21 humain dont 77 en 3 copies. Si le nombre de gènes exprimés varie selon les tissus (quasiment tous sont exprimés dans le cerveau, très peu dans les muscles), presque tous les gènes en 3 copies sont surexprimés (Kahlem et al., 2004).

Des résultats similaires ont été retrouvés en comparant l'expression des gènes dans le cerveau de nouveau-nés Ts1Cje (Amano et al., 2004). En 2005, notre laboratoire a publié

une étude comparée du transcriptome au cours du développement postnatal du cervelet chez les souris Ts1Cje, à P0 (postnatal day 0), P15 et P30 (Dauphinot et al., 2005). Tout au long du développement les gènes présents en 3 copies sont surexprimés de l'ordre de 50%. Enfin, en mesurant l'expression des gènes en 3 copies dans 9 tissus (cerveau, cœur, reins, foie, poumons et muscles) chez des souris Ts65Dn âgées de 30 jours et 11 mois par PCR quantitative en temps réel (Taqman real-time quantitative PCR) pour obtenir des mesures plus fines des quantités de transcrits, Lyle et al. ont observé une augmentation moyenne de l'expression des gènes en 3 copies de l'ordre de 50% dans tous les tissus. Cependant seulement $\frac{1}{3}$ de ces gènes sont réellement surexprimés de 50%. Près de la moitié des gènes en 3 copies sont surexprimés avec des rapports inférieurs à 50%, environ 20% sont surexprimés avec des rapports supérieurs à 50% et enfin 10% de ces gènes voient leur expression inchangée.

Cette augmentation de l'expression des gènes en 3 copies chez les individus porteurs de Trisomie 21 est appelée 'effet primaire'. Si en moyenne ces gènes en 3 copies sont généralement surexprimés de l'ordre de 50%, suivant ainsi le dosage génique, certains gènes échappent à cette règle et présentent des ratios statistiquement différents de 1,5 (inférieur ou supérieur) suggérant l'existence de mécanismes de régulation dans les cellules. Ces mécanismes dit de compensation et d'amplification ont surtout été étudié dans des modèles d'aneuploidie chez la drosophile et dans le maïs (Birchler, 1979; Devlin et al., 1982; Birchler et al., 2005).

En 2007, 3 équipes de recherche (dont notre laboratoire) ont tenté d'identifier ces gènes sensibles au dosage génique mais également soumis à des régulations génétiques (compensation ou amplification)(Ait Yahya-Graison et al., 2007; Sultan et al., 2007; Prandini et al., 2007). En utilisant des puces à ADN spécifiques des gènes du chromosome 21 et des cultures de lignées lymphoblastoïdes issues de patients trisomiques et contrôles, Ait Yahya-Graison et al. sont parvenus à classer les gènes du chromosome 21 en 4 classes (figure 4.3) :

1. ceux qui présentent un ratio de l'ordre de 1.5, suivant le dosage génique (27%),
2. les gènes amplifiés qui présentent un ratio significativement supérieur à 1.5 (7%),
3. les gènes compensés c'est à dire présentant un ratio inférieur à 1.5 (56%)
4. et une classe dite variable regroupant les gènes dont le ratio varie sensiblement selon les individus (15%).

Le but d'une telle classification est d'établir des listes de gènes candidats pour le phénotype de la Trisomie 21. Ainsi, les gènes constamment surexprimés mais non compensés ($27 + 7 = 34\%$) seraient potentiellement responsable du phénotype de la Trisomie 21 alors que les gènes variables expliqueraient les différences entre les individus porteurs de Trisomie 21 (Ait Yahya-Graison et al., 2007).

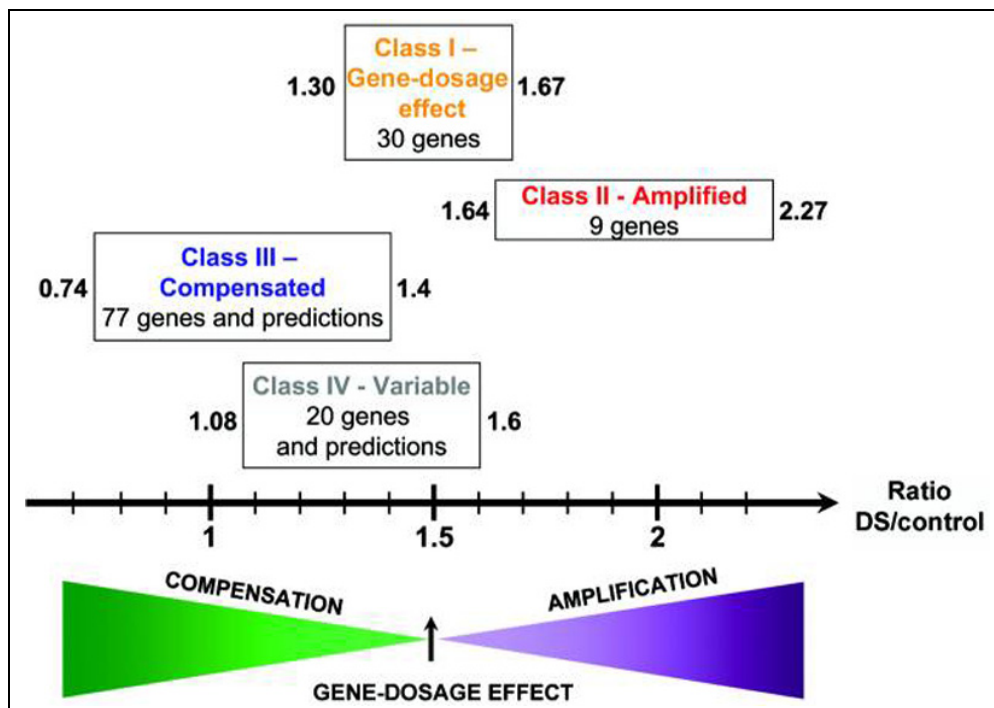


FIGURE 4.3: Classification des gènes du chromosome 21 en fonction de leur expression dans des lignées lymphoblastoïdes de patients porteur de Trisomie 21 et des contrôles. (Ait Yahya-Graison et al., 2007)

4.3 Quelles conséquences sur le transcriptome ?

Si l'effet de dosage génique est aujourd'hui bien établi, les résultats concernant les modifications de l'expression des gènes en 2 copies sont plus divergents.

Dans les échantillons issus de fœtus humains, Mao et al. (2005) n'ont pas mis en évidence des changements importants dans l'expression des gènes en 2 copies, contrairement à l'équipe de Fitzpatrick et al. (2000) qui montrait que la majorité des gènes les plus dérégulés n'étaient pas situés sur le chromosome 21 et contrairement à Lockstone et al. (2007) qui ont observé environ 4.4% de gènes dérégulés sur chaque chromosome dans son analyse du transcriptome sur des cerveaux adultes humains.

Dans les études menées dans des modèles murins, les résultats sont aussi parfois divergents. Saran et al. (2003) ont comparé l'expression des gènes dans le cervelet de souris Ts65Dn adultes en utilisant des puces à ADN. Son analyse révèle qu'en plus du dosage génique affectant les gènes en 3 copies (ratio moyen : 1,45), environ $\frac{1}{3}$ des gènes en 2 copies sont dérégulés chez les souris trisomiques, suggérant une déstabilisation globale du transcriptome.

Au contraire, l'analyse du transcriptome dans le cerveau de nouveau-nés Ts1Cje d'Amano et al. (2004) a révélé un niveau de transcrits identique entre les souris trisomiques et contrôles pour les gènes en 2 copies.

Enfin, dans leur étude au cours du développement du cervelet chez la souris Ts1Cje, Dauphinot et al. (2005) n'ont pas rapporté de déstabilisation du transcriptome aux différents stades étudiés. De plus, l'étude révèle que le nombre de gènes différentiellement exprimés entre les souris trisomiques et les souris contrôles à chaque stade est 2 fois moins important que le nombre de gènes régulés au cours du développement chez les souris contrôles.

Étant donnée la divergence des résultats concernant les modifications de l'expression des gènes disomiques chez les individus porteurs de Trisomie 21 et les modèles murins,

de nouvelles études du transcriptome intégrant les dernières innovations techniques et des modèles statistiques puissants appliqués à différents tissus et à différents stades de développement seront nécessaires afin d'obtenir des résultats cohérents.

4.4 'Effet de dosage génique' ou 'rupture de l'homéostasie' ?

Deux hypothèses sont proposées depuis les années 80 pour expliquer la relation entre la présence d'une troisième copie du chromosome 21 chez les individus porteurs de Trisomie 21 et le phénotype qui en découle.

1. La première hypothèse repose sur l' 'effet de dosage génique' (également appelée hypothèse qualitative). D'après ce modèle, le phénotype de la Trisomie 21 résulte directement de la surexpression de gènes individuels et/ou de groupes de gènes portés par le chromosome 21.
2. La seconde hypothèse appelée hypothèse quantitative, prétend qu'une grande partie du phénotype de la Trisomie 21 peut être expliqué comme le résultat d'une perturbation non spécifique de la quantité d'un certain nombre de transcrits induisant une rupture de l'homéostasie (Shapiro, 1983).

Cette deuxième hypothèse a été proposée pour expliquer certains traits phénotypiques retrouvés dans d'autres trisomies et le fait que les patients trisomiques ne développent pas de traits phénotypiques propres mais présentent des symptômes communs à la population générale à des fréquences plus élevées.

Cependant au delà des anomalies que développent les individus porteurs de différentes trisomies, il est possible de dégager des altérations propres à chacune des trisomies. Ainsi il semblerait que le choix entre ces 2 hypothèses repose sur l'importance donnée d'une part aux différences et d'autre part aux ressemblances prêtées aux individus porteurs de ces trisomies (Pritchard and Kola, 1999).

La génération de souris transgéniques pour des gènes du chromosome 21 semble fournir des arguments en faveur de l'hypothèse qualitative. En effet la surexpression spécifique de ces gènes induit chez la Souris des phénotypes communs aux patients porteurs de Trisomie 21 et aux modèles murins de trisomie 16 partielle (Kola and Hertzog, 1998; Kola and Pritchard, 1999; Salehi et al., 2007). Cependant, en l'absence d'études pangénomiques du transcriptome chez ces souris, on peut se demander si la surexpression des ces gènes n'induit pas à elle seule une perturbation non spécifique de l'expression des gènes provoquant les phénotypes observés.

Un deuxième argument en faveur de cette hypothèse a été apporté par l'étude des corrélations entre phénotype et génotype chez des personnes porteuses de Trisomie 21 partielle, c'est à dire trisomique pour une région du chromosome 21. La comparaison d'individus trisomiques pour des régions chevauchantes du chromosome 21 et présentant un phénotype similaire a même permis de définir une zone minimale appelée DSCR pour 'Down Syndrome Critical Region' présumée contenir un groupe de gènes dont la présence en 3 copies est suffisante pour expliquer un grande partie du phénotype de la Trisomie 21 (Delabar et al., 1993; Korenberg et al., 1994).

Ces 2 hypothèses ne sont pas exclusives. Une hypothèse alternative a été proposée, appelée 'sensitization model', dans laquelle les gènes soumis à l'effet du dosage génique n'auraient que peu d'effet par eux-mêmes mais pourraient provoquer un phénotype quand ils sont surexprimés en synergie avec un grand nombre d'autres gènes en 3 copies (Reeves et al., 2001).

Chapitre 5

Hypothèses et objectifs de travail

Sommaire

5.1	Contexte	41
5.2	Pathologie du cervelet dans la Trisomie 21	42
5.3	Caractérisation du phénotype cérébelleux	44
5.4	Analyse du transcriptome au cours du développement du cervelet	45
5.5	Caractérisation du génome de la lignée Ts1Cje	45

5.1 Contexte

Parmi les traits phénotypiques caractéristiques de la Trisomie 21 figurent de manière constante le retard mental ainsi que des défauts de motricité. Le cervelet, centre de l'équilibre et de la motricité, dont le volume se retrouve réduit de 25% chez les patients trisomiques présente le même phénotype dans différents modèles murins de la Trisomie 21 (Olson et al., 2004; Baxter et al., 2000). Ce phénotype n'étant pas corrélé avec l'âge, il est probable que sa cause survienne durant le développement du cervelet qui a lieu principalement au stade postnatal.

Notre projet a donc eu pour but de caractériser le phénotype cérébelleux dans notre colonie de souris Ts1Cje du point de vue anatomique et cellulaire ainsi que d'analyser le transcriptome du cervelet au cours des 10 premiers jours après la naissance afin d'identifier des gènes impliqués dans le développement du cervelet et dérégulés chez les souris trisomiques.

5.2 Pathologie du cervelet dans la Trisomie 21

Le cervelet est localisé au niveau postérieur de la base du cerveau (figure 5.1). Il reçoit des informations sensorielles, motrices, perceptuelles et cognitives de l'ensemble du système nerveux et envoie des informations vers le système moteur à l'exception des ganglions de la base. Le cervelet est souvent considéré comme un centre de la coordination de la posture, de l'exécution et de la coordination des mouvements. Il est aussi impliqué dans le maintien de l'équilibre et de la posture (Shapiro, 2001).

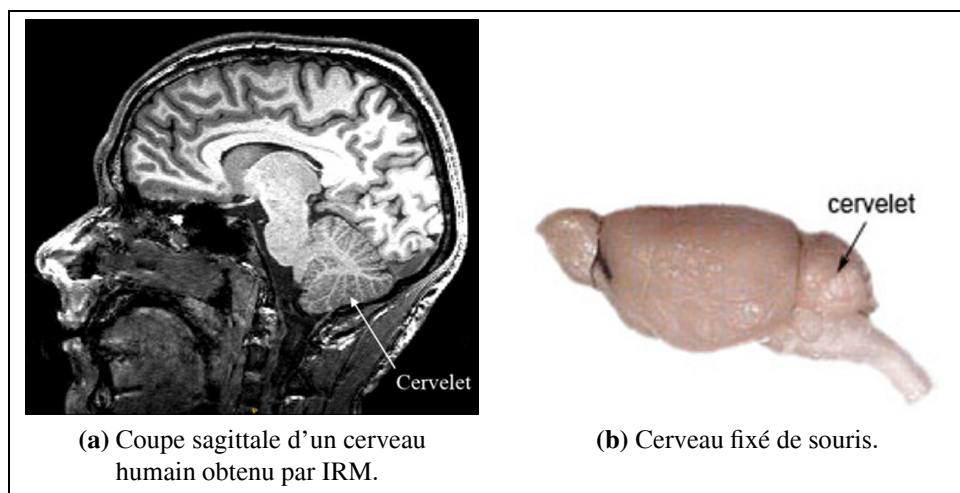


FIGURE 5.1: Localisation du cervelet chez l'homme (a) et chez la souris (b)

Son développement a lieu principalement au stade postnatal, au cours des 3 premières semaines de vie chez la Souris. Les neurones qui forment le cervelet proviennent de 2 régions primaires :

1. Les cellules de Purkinje ainsi que les neurones des noyaux profonds sont produits au niveau supérieur du quatrième ventricule. Ces cellules constituent les connexions efférentes principales du cervelet et du cortex cérébelleux. Chez la Souris, les cellules de Purkinje sont déjà présentes à la naissance, par la suite elles s'alignent en une mono-couche à l'interface entre la zone granulaire interne et de la couche granulaire externe (par la suite la couche moléculaire).
2. Une seconde zone germinative, 'la lèvre rhombique' (Rhombic lip en anglais) au niveau du rhombencéphale produit les précurseurs des cellules granulaires. Ces pré-

courseurs sont disposés à la surface du cervelet où ils prolifèrent formant ainsi la couche granulaire externe. La prolifération des cellules granulaires a lieu principalement au stade néonatal. Progressivement les cellules granulaires migrent à travers la couche des cellules de Purkinje pour former la couche granulaire interne. La couche granulaire externe disparaît vers le 15ème jour après la naissance chez la Souris. Les cellules granulaires du cervelet constituent la population neuronale la plus nombreuse du système nerveux central (Sotelo, 2004).

La figure 5.2 schématise le développement du cervelet au cours des 21 premiers jours de vie chez la Souris.

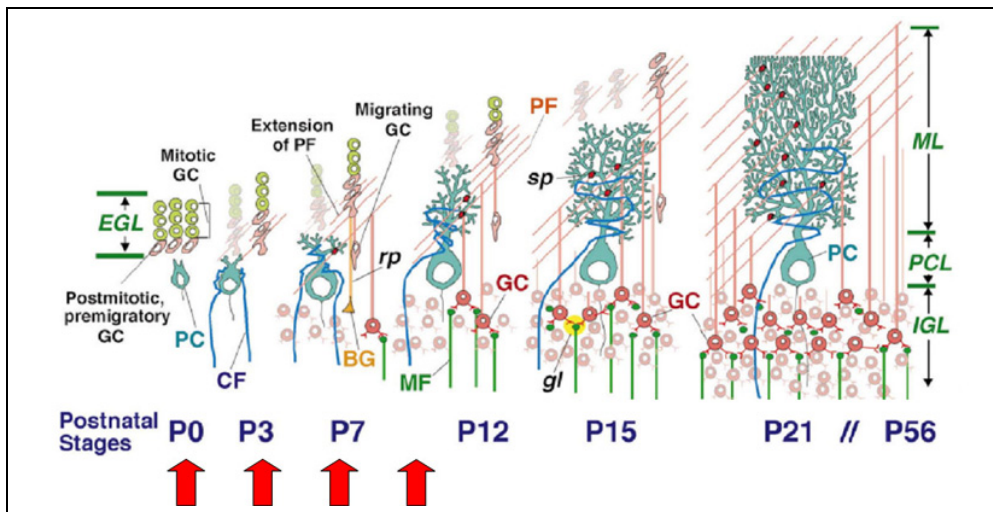


FIGURE 5.2: Développement postnatal du cervelet. GC : cellule granulaire, PC : cellules de Purkinje, CF : fibres grimpantes, BG : glie de Bergman, MF : fibres moussues, EGL : couche granulaire externe, PCL : couche des cellules de Purkinje, ML : couche moléculaire, IGL : couche granulaire interne. (Kagami and Furuichi, 2001)

Plusieurs études ont montré que le volume et le poids du cervelet sont réduits chez les individus porteurs de Trisomie 21 (Wisniewski, 1990; Raz et al., 1995; Pinter et al., 2001). Des analyses volumétriques effectuées par IRM ont montré que ce phénotype est également présent dans les 2 principaux modèles murins de la Trisomie 21 : les souris Ts65Dn et les souris Ts1Cje (Baxter et al., 2000; Olson et al., 2004). Une diminution d'environ 12% du volume du cervelet adulte a été rapportée dans 2 modèles. En plus d'une diminution du volume, ces mêmes études ont révélé une diminution de la densité

en cellule granulaire, la population neuronale majoritaire dans le cervelet, de l'ordre de 25% chez les souris Ts65Dn et de 10% chez les souris Ts1Cje. La figure 5.3 illustre ces 2 phénotypes chez la souris Ts65Dn.

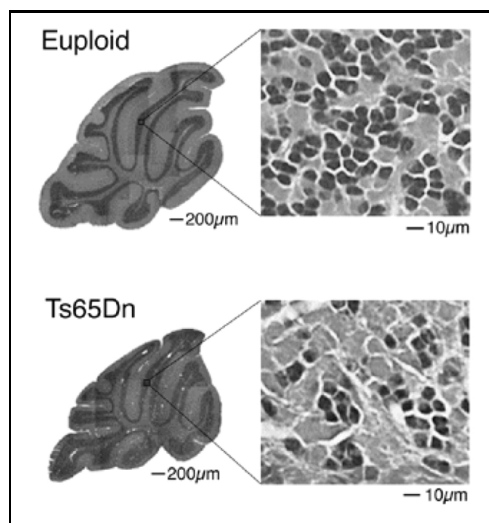


FIGURE 5.3: Réduction du volume du cervelet et de la densité des cellules granulaires dans la souris Ts65Dn. (Baxter et al., 2000)

5.3 Caractérisation du phénotype cérébelleux

Afin d'étudier les événements précoces responsables de la diminution de la densité des cellules granulaires et de la réduction du volume du cervelet, nous avons dans un premier temps procédé à l'étude histologique du développement du cervelet chez des souris trisomiques Ts1Cje et contrôles à P0, P3 et P7 à l'aide de marquages immunohistochimiques spécifiques de la prolifération. Cette étude, initiée dans notre équipe par Fabien Pasteau, a été faite en collaboration avec Isabelle Dusart et Rosine Wehrle (UPMC - CNRS UMR7102). Nous avons pu mettre en évidence une diminution de la prolifération des progéniteurs des cellules granulaires situées dans la couche externe à P0 mais pas à P3 ni P7.

Nous avons également mesuré les conséquences chez l'adulte de ce défaut de prolifération. Nous avons procédé à une série de mesures volumétriques du cerveau et du cervelet par imagerie par résonance magnétique (IRM). Pour cela, nous avons utilisé le scanner

pour petits animaux de 7 Tesla du laboratoire Ondes et Acoustique (LOA - ESPCI) et nous avons mis au point une séquence en collaboration avec Ralph Sinkus et Benoit Larat (LOA - ESPCI). Nous avons ainsi pu mettre en évidence une diminution du volume du cervelet d'environ 16% chez les souris mâles trisomiques par rapport aux souris contrôles.

5.4 Analyse du transcriptome au cours du développement du cervelet

Nous avons mesuré l'expression des gènes chez les souris Ts1Cje et contrôles à l'aide de puces pangénomiques de souris à 4 stades critiques du développement postnatal du cervelet : P0, P3, P7 et P10. C'est en effet durant cette période que se déroulent les principaux événements du développement du cervelet : prolifération des progéniteurs neuro-naux dans la couche externe, migration vers la couche interne, différenciation des cellules granulaires ainsi que le nivellement et la maturation des cellules de Purkinje (résumé sur la figure 5.2).

Nous avons pu ainsi caractériser les conséquences du déséquilibre génique sur le génome au cours du développement et dégager une liste de gènes candidats que nous avons ensuite analysés par PCR quantitative (PCRq).

Compte tenu des résultats d'immunohistochimie sur la prolifération des précurseurs neuronaux, nous avons réalisé une seconde étude de transcriptome à P0 à partir de dissections de la couche externe du cervelet de souris Ts1Cje et contrôles à l'aide de puces à ADN pangénomique. Cette analyse a révélé que les gènes dont l'expression est la plus significativement modifiée sont les gènes présents en 3 copies montrant ainsi la prépondérance de l'effet primaire de dosage génique.

5.5 Caractérisation du génome de la lignée Ts1Cje

Cette dernière analyse a révélé 2 gènes dont l'expression est diminuée de 50% dans la couche externe du cervelet chez les souris Ts1Cje. Ces 2 gènes étant localisés dans la

région télomérique du chromosome 12, près du point de translocation de la partie distale du chromosome 16, nous avons émis l'hypothèse que ces 2 gènes puissent être délétés au cours de la translocation. Nous avons donc procédé à une comparaison du génome des souris Ts1Cje avec des souris contrôles à l'aide de puce CGH et nous avons pu montrer la délétion d'un fragment d'environ 2Mb dans la partie distale du chromosome 12.

Matériels et Méthodes

Les souris Ts1Cje

Obtention et conservation de la lignée

La lignée Ts1Cje est trisomique pour la partie distale du chromosome 16, du gène *Sod1* au gène *Znf295* (figure 3.2 page 27). La région dupliquée est située sur la partie télomérique du chromosome 12. Les portées nécessaires à cette étude ont été fournies par Yann Hérault, responsable scientifique de l'Institut de Transgénose à Orléans. La colonie a été maintenue par croisement des mâles Ts1Cje avec des femelles sauvages sur un fond génétique mixte B6C3SnF1/Orl.

Génotypage

La 'Polymerase Chain Reaction' ou PCR est une technique de réplication ciblée d'un fragment d'ADN *in vitro* imaginée par K. Mullis en 1985 (Prix Nobel 1993). Chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques ou «primers» en anglais qui définissent en la bornant la séquence à amplifier. L'amplification se déroule de façon exponentielle.

Le croisement de mâles Ts1Cje avec des femelles sauvages nous a permis de travailler avec des portées comprenant en moyenne 50% d'animaux trisomiques et 50% d'animaux euploïdes i.e. contrôles. Afin de distinguer les souris portant la duplication de la partie distale du chromosome 16, toutes les souris ont été génotypées par PCR quantitative avec des amorces spécifiques du gène codant pour la Néomycine. En effet, ces souris possèdent une cassette Néo qui a été insérée dans la séquence codante du gène *Sod1* situé sur la partie

dupliquée du chromosome 16.

Les amorces utilisées sont les suivantes :

– amorce 1 : TATTCGCTATGACTGGGCACAAC

– amorce 2 : TTCAGTGACAACGTCGAGCACA

Les réactions de PCR ont été effectuées dans un LightCycler à 32 capillaires (Roche) avec le programme suivant :

Étapes	Cycles	Température	Transition
Dénaturation	: x1	95°C	15min 20°C/sec
Amplification	: x40	94°C	15sec 20°C/sec
		60°C	20sec 20°C/sec
		72°C	20sec 20°C/sec
		94°C	0sec 20°C/sec
‘Melting Curve’	: x1	65°C	25sec 20°C/sec
‘Cooling’	: x1	95°C	0sec 0.1°C/sec
		40°C	30sec 20°C/sec

Chaque réaction a été faite dans un capillaire en verre dans un volume de 20 μ l en utilisant le kit QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen). Le SYBR green est un intercalant de l'ADN qui émet une fluorescence lorsqu'il se fixe à l'ADN double brin. Le niveau de fluorescence dans chaque capillaire est donc proportionnel à la quantité d'ADN synthétisé. Le LightCycler mesure le niveau de fluorescence dans chaque capillaire à la fin de chaque cycle de PCR.

Comme on peut le voir sur les courbes d'évolution de la fluorescence au cours du temps (figure 1.4), la phase exponentielle de répliation des échantillons d'ADN contenant la cassette Neo, correspondant aux animaux Ts1Cje, se situe autour de 24 cycles de PCR. Les échantillons contrôles ne possédant pas la cassette Néo ne présentent pas d'élévation de fluorescence avant 35 cycles (cette fluorescence témoigne d'une réaction non spécifique due aux complexes d'amorces). Toutes les mesures ont été faites en triplicat.

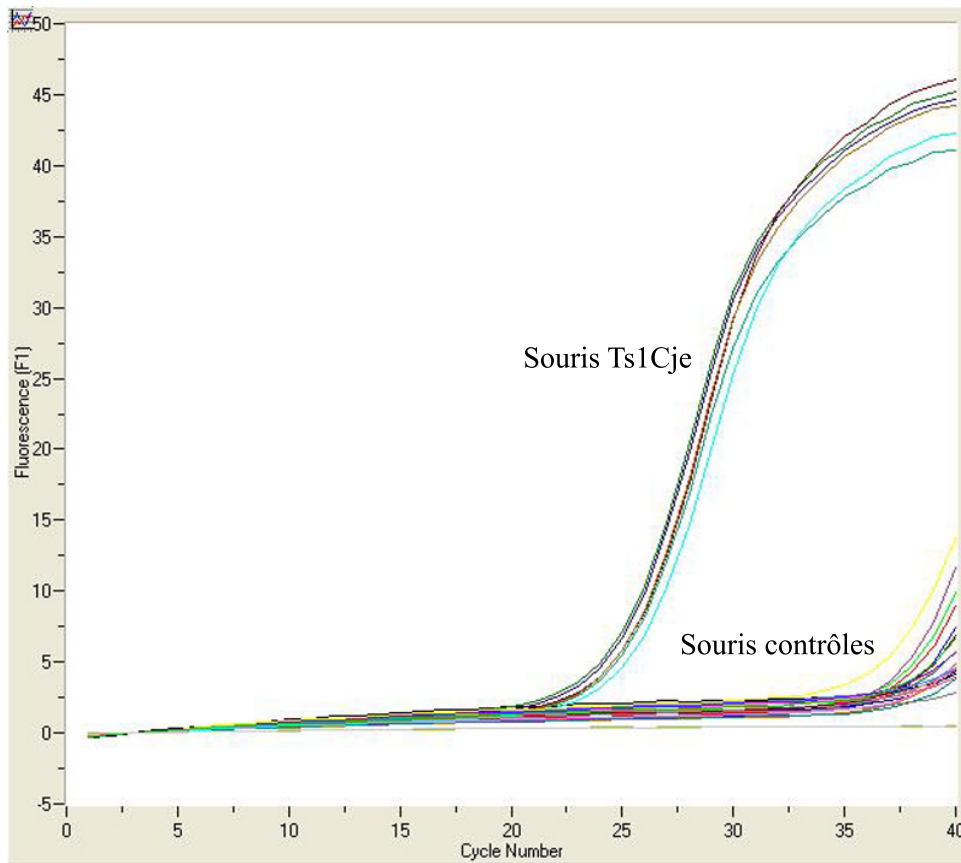


FIGURE 1.4: Courbe de fluorescence au cours des cycles de PCR (LightCycler software v3)

Marquages immunohistochimiques

Plan expérimental

Les comptages des cellules en prolifération et des cellules totales ont été fait sur 9 souris Ts1Cje et 9 souris contrôles âgées de 0, 3 et 7 jours provenant de 3 portées dans une zone délimitée au niveau de la fissure primaire.

dissection, conservation et préparation des tissus

Les souris ont été anesthésiées puis fixées avec une solution de paraformaldéhyde à 4% par perfusion intra cardiaque dans du tampon phosphate 0,12M, pH 7,2. Après dissection, les cerveaux ont été cryoprotégés dans une solution de saccharose à 30% dans du tampon phosphate à 4°C pendant 48h puis congelés à -80°C. Les coupes sagittales d'une épaisseur de 16 μ m ont été faites au cryostat dans de l'OCT Compound (Tissue-Tek) et conservées à -80°C.

Marquage des lames avec l'anticorps anti-Ki67

- Lavage des lames 5 minutes dans du PBS + Triton 0,25%.
- Blocage des sites non spécifiques par incubation des lames pendant 45 minutes dans du Tampon phosphate (PBS) + gélatine (2g/l) + lysine 0,1M + azide (1g/l) + triton 0,25%.
- Incubation des lames sur la nuit à température ambiante en présence de l'anticorps primaire NCL-Ki67p (Novo Castra) dilué au 1/1000° dans une solution Tampon

- phosphate (PBS) + gélatine (2g/l) + azide (1g/l) + triton 0,25%.
- 4 rinçages de 10 min dans du PBS + Triton 0,25%.
 - Incubation 2 heures à température ambiante avec l'anticorps secondaire biotinylé anti-lapin IgG (H+L) (Valbiotech) dilué au 1/200° dans du PBS + gélatine (2g/l) + triton 0,25%.
 - 4 rinçages de 10 min dans du PBS + Triton 0,25%.
 - Incubation pendant 2 heures à température ambiante avec le complexe streptavidine-peroxydase (Streptavidin Biotinylated Horseradish Peroxydase Complex, Amersham Pharmacia Biotech) dilué au 1/400° dans une solution de PBS + gélatine (2g/l) + triton 0,25%.
 - 4 rinçages de 10 min dans du PBS + Triton 0,25%.
 - Révélation par la DiAminoBenzidine (DAB à 30 mg/ml dans tris 0,1M pH 7.6 + H₂O₂ 1%) pendant 12 min.
 - Rinçage 10 min dans tris 0,1M pH 7.6
 - Séchage des lames à l'air libre.

Contre-coloration des lames avec une solution de Crésyle-Violet Thionine

- Rinçage des lames dans de l'eau distillée.
- Incubation 3min à 10min des lames dans une solution de Crésyle-violet 1% + thionine 1% tamponnée.
- Rinçage des lames dans de l'eau distillée.
- Différenciation dans un bain d'éthanol 80° additionné de 2 à 3 gouttes d'acide acétique pur.
- Incubation des lames dans un bain d'éthanol 95° pendant 3min.
- Incubation des lames dans trois bains d'éthanol 100° pendant 3min.
- Incubation des lames dans trois bains de Xylène pendant 3min.
- Montage des lamelles sur les lames avec la solution Eukitt (Quick-hardening moun-

ting medium, Flucka Biochemika)

Acquisition, comptage et analyse des données

Après montage sous lamelle, les coupes marquées ont été photographiées avec un microscope Leica équipé d'une caméra QICam Fast 1934 CCD (QImaging) avec un objectif x20. Les cellules Ki67⁺ marquées par la DAB (cellules marrons) et les cellules colorées par la solution de crésyl-violet (en bleu) ont été dénombrées séparément avec le logiciel Image-Pro Plus. L'index de prolifération a été défini comme le ratio entre le nombre de cellule Ki67⁺ et les cellules crésyl-violet⁺. L'ensemble des comptages a été soumis au test de Student (*t*-test, $\alpha = 5\%$).

Imagerie par résonance magnétique

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) permet de visualiser avec une grande précision de nombreux organes tels que le cerveau dans des animaux vivants. Elle permet de faire des images en coupes dans différents plans et de reconstruire en trois dimensions la structure analysée.

Son principe consiste à réaliser des images en utilisant les milliards d'atomes d'hydrogène que contient un organe. Un puissant champ magnétique permet d'orienter les atomes d'hydrogène dans une même direction puis une excitation par des ondes radio durant une très courte période permet de les mettre en résonance. A l'arrêt de cette stimulation, les atomes restituent l'énergie accumulée en produisant un signal qui est enregistré et traité sous forme d'image par un système informatique.

Plan d'expérience

Pour notre expérience nous avons reconstitué le cerveau de 6 souris mâles Ts1Cje adultes et de 9 souris mâles euploïdes adultes issus de 4 portées. Les femelles initialement prévues ont été écartées à cause de la plus grande variabilité des résultats obtenus lors des premières expériences. Les volumes du cerveau et du cervelet des animaux trisomiques et contrôles ont été comparés par portée dans un premier temps puis en regroupant tous les individus. Les résultats obtenus ont été soumis au test de Student (t -test, $\alpha = 5\%$).

Protocol d'acquisition

L'appareil utilisé est un scanner pour petits animaux d'une puissance de 7 Tesla (Bruker Pharmascan, Ettlingen, Germany). Les souris ont été anesthésiées à l'isoflurane 4% quelques minutes avant l'expérience puis soumises à un flux constant d'isoflurane 2% durant toute la séquence. La respiration fut contrôlée durant toute l'expérience.

Après de nombreux essais, nous avons retenu un protocole d'acquisition basé sur une séquence TurboRare-3D avec les paramètres suivants :

Champ de balayage	: 2cm x 2cm x 2cm
Taille de la matrice	: 196 x 196 x 196
Résolution	: 102 μ m isotropes
Temps de répétition (TR)	: 1500ms
Temps d'échos (TE)	: 43ms
Nombre de moyennage	: 2
temps d'acquisition	: 1h58

Traitement des données

Les fichiers d'acquisition ont été exportés au format DICOM (Digital Imaging and COmmunications in Medecine). Les volumes du cerveau et du cervelet de chaque souris ont été déterminés grâce au logiciel Insight-SNAP (www.itksnap.org). Ce logiciel permet de visualiser les images dans les 3 plans orthogonaux (coronal, sagittal et horizontal). Pour le cerveau, l'aire a été déterminée en utilisant un algorithme automatique appelé 'snake evolution algorithm' dans un premier temps puis corrigée manuellement dans les 3 plans. Pour le cervelet, l'aire a été déterminée entièrement manuellement dans les 3 plans. La figure 5.5 page 56 est un exemple de reconstruction du cerveau (en vert) et du cervelet (en rouge) d'une souris contrôle à partir des images générées par le logiciel dans les 3 plans orthogonaux .

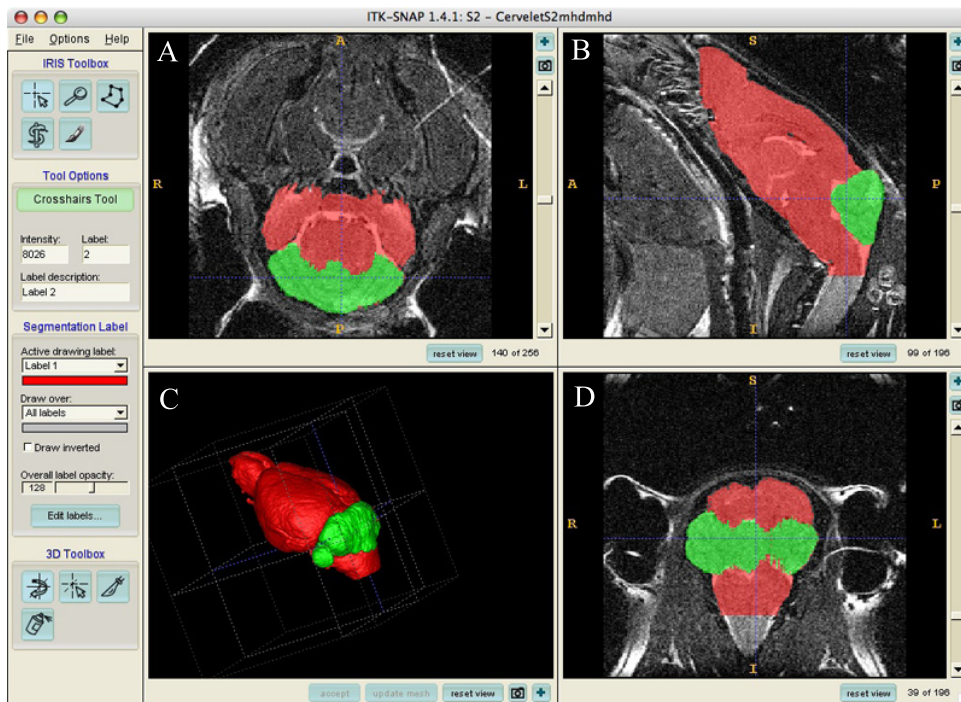


FIGURE 5.5: Visualisation des données d'IRM d'une souris Ts1Cje adulte : sections virtuelles coronale (A), sagittale (B) et horizontale (D) puis reconstruction 3D (C). Sont délimités en rouge le cerveau et en vert le cervelet

Analyse du transcriptome du cervelet avec des puces à ADN RNG/MRC sur lame de verre

Plan expérimental

L'expression des gènes du cervelet a été analysée chez 28 souris Ts1Cje et 28 souris contrôles à P0 (2x6 souris), P3 (2x8), P7 (2x8) et P10 (2x6) à l'aide de 28 puces à ADN pangénomiques 2-couleurs contenant environ 25 000 sondes (RNG/MRC mouse pangenomic microarrays, Le Brigand et al., 2006). Sur chaque puce nous avons comparé un échantillon Ts1Cje et un échantillon contrôle. De plus, nous avons toujours hybridé des échantillons provenant de souris dont la différence d'âge était inférieure à 4 jours (P0 versus P3, P3 versus P7 ou P7 versus P10) (figure 2.2 page 75).

Extraction et quantification des ARN

Après dissection et broyage des cervelets avec un polytron (kinematica), les ARN totaux ont été extraits à l'aide du kit RNeasy Minikit (Qiagen) qui comprend un traitement à la DNase. La quantité et la qualité de chaque échantillon ont été testées sur des puces Agilent RNA 6000 Nano par un Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies).

Reverse transcription et marquage des ARN

Cinq μg d'ARN total de chaque cervelet ont été rétro-transcrits en ADN complémentaire sur la nuit à 37 °C en utilisant le kit 'Verso cDNA kit' (ThermoScientific) en présence d' amino allyl-dUTP puis purifiés sur colonne Qiaquick (Qiagen) et incubés pendant 10 minutes en présence de NaHCO_3 0.05M (Sigma) et 1h avec de la Cy3 ou de la Cy5 NHS-ester (GE Healthcare).

Hybridation des cDNA sur puce

Après purification, les paires d'échantillons marqués (l'un en Cy3, l'autre en Cy5) ont été hybridées sur des puces pangénomiques dans un tampon d'hybridation (50% formamide, 4X saline sodium citrate [SSC], 0.1% SDS, and 5X Denhart) à 42 °C sur la nuit. Les lames ont ensuite été lavées dans des solutions salines de plus en plus stringentes : 2X SSC et 0.1% SDS pendant 5', 1X SSC pendant 5', 0.2X SSC pendant 5' et 0.05X SSC pendant 5' puis séchées par centrifugation pendant 4' à 800 rpm.

Lecture de la puce et traitement du signal

Les lames ont été lues par un scanner à 2 lasers Scan Array Gx (Perkin Elmer) avec une résolution de $5\mu\text{m}$ et analysées avec le logiciel GenePix Pro 4.1 (Axon). Pour chaque puce nous avons extrait le signal médian de chaque spot aux longueurs d'onde de 635nm and 532nm correspondant aux longueurs d'onde d'excitation de la Cy5 et la Cy3. Après soustraction du bruit de fond de chaque spot, les données ont été normalisées par LOWESS (local LOWESS) en utilisant les valeurs des ratios Cy5/Cy3 en \log_2 sous le logiciel R (www.r-project.org).

Analyse du transcriptome de la couche externe du cervelet à l'aide de puce Illumina

Plan expérimental

Pour cette analyse du transcriptome de la couche externe du cervelet nous avons utilisé 9 souris Ts1Cje et 9 souris contrôles à P0 provenant de 3 portées. Les échantillons ont été hybridés sur 3 lames contenant chacune 6 puces pangénomiques (Mouse-6 Expression BeadChips, Illumina) d'une capacité de détection d'environ 45 000 sondes. Les échantillons de chaque portée ont été hybridés sur une même lame.

Extraction et quantification des ARN

Les ARN totaux ont été extraits à partir de dissection de la couche externe de cervelets individuels et ont été quantifiés comme expliqué précédemment (page 57).

Reverse transcription, marquage et hybridation

Cinquante ng d'ARN de chaque échantillon ont été rétro-transcrits en ADN complémentaire puis en ARN complémentaire biotinylé, marqués avec de la Cy3 et hybridés sur des puces pangénomiques 'mouse 6 Beadchip' par la plateforme Illumina de la société Integragen basée à Evry (France) selon les procédures indiquées par Illumina.

Lecture de la puce et traitement du signal

La lecture des lames a été faite par un scanner 'BeadStation 500' (Illumina) avec une résolution de $0.8\mu\text{m}$ à une longueur d'onde de 532nm. Puis les données ont été extraites par le logiciel 'Beadstudio software' (Illumina). Les données brutes fournies correspondent au signal moyen d'environ 30 à 60 billes portant des sondes identiques. Nous avons normalisé les données brutes en fonction de la moyenne globale du signal sur les 18 puces.

Analyse du génome par puce CGH

Les puces CGH (Comparative genomic hybridization) permettent de détecter des modifications du nombre de copies d'une séquence d'ADN dans le génome d'un individu. Elles sont souvent utilisées en cancérologie afin de définir les anomalies de structure du génome caractéristiques d'une tumeur donnée. Comme pour les puces à ADN différentielles sur lame de verre (page 57), la stratégie des puces CGH est basée sur l'hybridation compétitive de 2 échantillons, ici de l'ADN génomique, marqués avec 2 fluorophores différents sur une puce contenant des milliers de sondes spécifiques pour des milliers de séquences à travers le génome. Le ratio de fluorescence des 2 échantillons pour chaque sonde reflète les quantités relatives de chaque séquence d'ADN dans l'échantillon à tester par rapport à l'échantillon témoin. Si cette technique est très sensible pour détecter les délétions ou les duplications, elle est totalement incapable de détecter les translocations réciproques ou les inversions.

Plan d'expérience

Pour cette étude nous avons hybridé les ADNs de 2 souris mâles Ts1Cje et de 2 souris femelles contrôles sur 2 puces CGH (Agilent Technologies) possédant environ 235 000 sondes spécifiques réparties dans tout le génome murin et permettant d'établir le profil de variation du nombre de copie de gène avec une résolution moyenne de 6,4kb.

Extraction et quantification des ADNs

L'ADN des 4 souris a été extrait en utilisant le kit DNeasy (Qiagen) à partir de bouts de queues de souris incubées en présence de protéinase K et quantifié par spectrophotométrie sur un Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies).

Marquage et hybridation des ADN

Les étapes de marquage et d'hybridation sur les puces ont été faites par la société DiagnoGene basée à Orléans (France). Brièvement, $1,5\mu\text{g}$ d'ADN génomique de chaque échantillon ont été soumis à une digestion enzymatique par *AluI* et *RsaI* puis marqué à la Cy5 pour les échantillons Ts1Cje ou à la Cy3 pour les échantillons contrôles à l'aide d'amorces aléatoires (Agilent Genomic DNA Labeling Kit PLUS). Les cibles marquées ont été hybridées sur des puces CGH à 65°C pendant 40h.

Analyse des résultats

Les puces ont ensuite été lues par un scanner Agilent à une résolution de $5\mu\text{m}$ et les données ont été extraites par le logiciel 'Feature Extraction software v9.5.1'. Les données ont ensuite été analysées par le logiciel 'CGH Analytics' qui permet de détecter les aberrations chromosomiques dans le génome en visualisant les ratios de fluorescence des sondes le long de chaque chromosome. Pour rechercher les aberrations chromosomiques nous avons utilisé l'algorithme récursif de détection des aberrations ADM2 (Aberration Detection Method) proposée par le logiciel. Les résultats ont ensuite été filtrés, seules les régions possédant au moins 10 sondes variant avec une valeur absolue du \log_2 ratio supérieure ou égale à 0.3 ont été retenues.

Mesure de l'expression des gènes par PCR quantitative en temps réel

Nous avons mesuré l'expression de 26 gènes par PCR quantitative en temps réel. A cette fin, nous avons adopté la méthode Taqman qui permet une mesure plus fiable (i.e. spécifique) de la fluorescence. En effet la méthode Taqman repose sur l'utilisation de 2 amorces spécifiques du gène à amplifier et d'une sonde spécifique située entre les 2 amorces. A l'extrémité 5' de la sonde se trouve un fluorochrome ('reporter') et à son extrémité 3' se trouve un groupement 'quencher' qui absorbe toute émission du fluorochrome. Durant l'étape d'élongation de la PCR, il y a séparation du fluorochrome de la sonde suite à l'activité 5'-3' exonucléase de la Taq polymérase. Il y a alors émission de la fluorescence. L'intensité de la fluorescence est ainsi directement proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisée au cours de la réaction de PCR.

Plan d'expérience

L'expression de chaque gène dans le cervelet à P0 a été mesurée en triplicat chez 6 souris Ts1Cje et 6 souris contrôles issues de 3 portées.

Extraction et quantification des ARN

Les ARN ont été extraits comme indiqué à la page 57. Puis, $1\mu g$ d'ARN total de chaque cervelet individuel ont été reverse-transcrits en ADN complémentaire (cDNA) sur la nuit à $37^\circ C$ en utilisant le kit 'Verso cDNA kit' (ThermoScientific).

Protocole de qPCR

Les réactions de PCR ont été effectuées dans un LightCycler 480 System (Roche Molecular Biochemicals) avec le programme suivant :

Étapes	Nombre de cycles	Température	Temps	Vitesse de transition	
Pré-incubation	: x1	95°C	10min	4,4°C/sec	
Amplification	:	x50	95°C	10sec	4,4°C/sec
			60°C	30sec	2,2°C/sec
			72°C	1sec	4,4°C/sec
Cooling	: x1	40°C	30sec	2,2°C/sec	

Toutes les réactions ont été faites dans des plaques de 96 puits dans un volume de 10 μ l en utilisant le kit 'LightCycler 480 Probes Master' (Roche). Comme dans le système SYBR Green, à chaque cycle de PCR, le LightCycler mesure le niveau de fluorescence dans chaque puit. Le niveau de fluorescence augmente à mesure que la Taq polymérase libère le fluorophore de la sonde spécifique à chaque cycle d'élongation de la PCR.

La table 7.1 donne la liste des gènes analysés par PCR quantitative avec les couples d'amorces et les sondes correspondantes. Les amorces ainsi que les sondes ont été choisis par le logiciel en ligne 'Universal ProbeLibrary Assay Design Center' (www.roche-applied-science.com).

Analyse des résultats

Toutes les mesures ont été normalisées avec le gène *Actb*. Les ratios d'expression Ts1Cje/contrôle ont été effectués par portée ainsi qu'en regroupant tous les animaux puis soumis au test de Student (*t*-test, $\alpha = 5\%$).

Gene	UPL	amorce gauche	amorce droite
<i>Actb</i>	#56	AAGGCCAACCGTGAAAAGAT	GTGGTACGACCAGAGGCATAC
<i>Ccna2</i>	#4	CTTGGCTGCACCAACAGTAA	CAAACCTCAGTTCTCCCAAAAACA
<i>Cd24a</i>	#68	CTGGGGTTGCTGCTTCTG	AGATGTTTGGTTGCAGTAAATCTG
<i>Dscam</i>	#72	CTCGTGGATGTCTCCGATG	AGCCTTTGCATTCCCTCCTG
<i>Rcan1</i>	#60	GGCTGCACAAGACCGAGT	GTGTGAACTTCCTATGTGTAAAGTCTG
<i>Dyrk1a</i>	#25	TCAGTCTTCAGGCACCACCT	TGTTACTCGTTCCCGAGGAT
<i>Gli1</i>	#85	TGGAGGTCTGCGTGGTAGA	TTGAACATGGCGTCTCAGG
<i>Gli2</i>	#110	CCTGCATGCTAGAGGCAAAC	CTGGGGCAGAAGTCTCCAT
<i>GluR1</i>	#62	AGGGATCGACATCCAGAGAG	TGCACATTTCTGTCAAACC
<i>Hmg14</i>	#110	ATGGAGAGACGGAAAACCAG	GACGTGATGGATGCTTAGTCG
<i>Ift88</i>	#29	CAGCAAGCAGTGAGAACCAG	GCTGTGCTTGGTATTTTAGCAG
<i>Itch</i>	#20	CATGGGATAGACCAGAACCTCT	AATACGTCCCATATTGTCCACAC
<i>Itga6</i>	#21	GACCAGTGGATGGGAGTCAC	GCTGCCGTTTCTCATATCG
<i>Girk2</i>	#58	TGCTCCGTTCCGAGAGAG	CATTTCTTCTTTGTGCTTTTCCTT
<i>Nfat1</i>	#5	CAACGGAAAGAGGAAACGAA	CTGTCTTGATGGCAGGGACT
<i>Nfatc2</i>	#89	TCCAGAGTCCATCCTGCTG	GTGGGAGGGATGCAGTCA
<i>Notch2</i>	#64	CAACCCTTGACAGCTCAGAA	CACACATCTAGGAAGGTTTCACA
<i>Npc1</i>	#9	TCTGAATGCGGTCTCCTTG	ATGGCTGCAGAACTCCACA
<i>Numb</i>	#12	AGGAAGACCGATTTCCCAAT	CAAGGAGCTGATGCTCTCG
<i>Olig1</i>	#20	GGCCCAGTTCTCCAAGTG	GGGAAGATTGGCTGAGGTC
<i>Pax2</i>	#20	CACTGATCCTGCCACATTA	CAGAGCCCTCAGACACATCTC
<i>Psen2</i>	#89	GGTGCCATCTCTGTGTACGA	TCATTTCTCTCCTGGGCAGT
<i>Ptch1</i>	#56	GGAAGGGGCAAAGCTACAGT	TCCACCGTAAAGGAGGCTTA
<i>Shh</i>	#32	ACCCCGACATCATATTTAAGGA	TTAACTTGTCTTTGCACCTCTGA
<i>Son</i>	#12	TCCGGGAAATACAACAGGAG	GGGTGGATTTGTTTCACCAT
<i>Dnahc11</i>	#97	CCATAACTGTGCGTGATAAAGTCT	CCGACAGACCGTCTTGGTAT
<i>Cdca7l</i>	#29	TCTCAGAAGGTTTGCCAAGGA	GGCTCTTAGGGAGGTTGTCA

TABLE 7.1: Liste des amorces utilisées pour PCR quantitatives. UPL : se rapporte au numéro de la sonde correspondante dans la ‘Roche Universal Probe Library’.

Résultats

Chapitre 1

Étude morphologique et histologique du cervelet chez les souris Ts1Cje adultes

1.1 Le volume du cervelet est réduit chez les souris Ts1Cje.

Contrairement aux souris Ts1Cje utilisées par Olson et al. (2004) produites sur le fond génétique C57Bl/6Jei x C3H/HeJ, notre colonie de souris Ts1Cje été produite sur un fond génétique mixte B6C3SnF1/Orl. Afin de s'assurer que l'hypoplasie cérébelleuse rapportée dans ce modèle était bien présente dans notre colonie, nous avons mesuré le volume global du cerveau ainsi que le volume du cervelet chez 6 souris mâles Ts1Cje adultes et 9 souris mâles contrôles adultes issues de 4 portées par imagerie par résonance magnétique (IRM) avec une résolution de $102\mu\text{m}$.

L'IRM a déjà été utilisée dans le passé pour mesurer le volume du cerveau et du cervelet chez des souris trisomiques, mais ces expériences ont toujours été faites sur des cerveaux fixés et disséqués (Baxter et al., 2000; Olson et al., 2004). Afin d'éviter de possibles biais pouvant survenir lors de la perfusion et de la fixation des cerveaux, nous avons décidé d'imager nos souris vivantes.

La principale difficulté a donc été de trouver une séquence d'IRM courte mais capable de produire un signal assez résolutif pour reconnaître sans ambiguïté le cervelet au sein du cerveau et le reconstruire en 3 dimensions. Après de nombreux essais, nous avons retenu une séquence d'une durée de 1h58 et d'une résolution de $102\mu\text{m}$.

La table 1.1 résume les résultats obtenus. Nous n'avons observé aucune différence dans le volume du cerveau entre les souris Ts1Cje et les souris contrôles. Par contre nous avons observé une diminution du volume du cervelet d'environ 16% chez les souris Ts1Cje par rapport aux souris contrôles. Cette diminution est toujours présente lorsque le volume du cervelet est normalisé par rapport au volume du cerveau entier (-17%). Cette diminution est significative ($p = 0,028$) d'après le test de conformité de Student (t test). Nous confirmons donc les résultats obtenus par Olson et al. sur un fond génétique différent (environ -11%, Olson et al., 2004).

	Cerveau	Cervelet	Cervelet normalisé
Contrôles (n = 9)	$599mm^3 \pm 24,2$	$68mm^3 \pm 7,1$	$0,114mm^3 \pm 0,013$
Ts1Cje (n = 6)	$608mm^3 \pm 20,4$	$57mm^3 \pm 7,3$	$0,094mm^3 \pm 0,014$
rapports des volumes	102%	84%	83%
p -valeur (t -test)	0,47	0,028	0,028

TABLE 1.1: Volumes moyens du cerveau et du cervelet chez les souris Ts1Cje et contrôles adultes. Le volume du cervelet a été normalisé par rapport au volume du cerveau entier.

1.2 Les cellules granulaires prolifèrent moins vite à la naissance dans les souris Ts1Cje.

Le développement du cervelet a lieu principalement au stade postnatal, au cours des 3 premières semaines de vie chez la Souris. Le développement postnatal du cervelet chez la Souris est schématisé sur la figure 5.2 page 43. A la naissance, les neurones de Purkinje sont déjà présents, au bout de quelques jours ils formeront une monocouche à l'interface des couches granulaires internes et externes du cervelet. Les précurseurs des cellules granulaires forment la couche externe. Ils prolifèrent massivement au cours des premiers jours après la naissance et migrent progressivement à travers la couche des neurones de Purkinje pour former la couche granulaire interne où ils matureront et développeront leurs connexions. La couche des précurseurs des cellules granulaires disparaît environ 15 jours après la naissance. La couche granulaire externe sera alors remplacée par la couche dite 'moléculaire' (Sotelo, 2004).

Baxter et al. ayant rapporté que la diminution du volume du cervelet chez les souris Ts65Dn s'accompagne d'une diminution de la densité des cellules granulaires et ne résulte pas d'un processus neurodégénératif (Baxter et al., 2000), nous avons comparé la prolifération de ces progéniteurs situés dans la couche granulaire externe du cervelet chez les souris Ts1Cje par rapport aux souris contrôles lors du développement postnatal du cervelet.

Nous avons procédé à des marquages immunohistologiques en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine Ki67. La protéine Ki67 est exprimée à la surface des noyaux des cellules en prolifération et constitue donc un marqueur de prolifération cellulaire. Nous avons mesuré la prolifération à 3 stades du développement postnatal du cervelet : P0 (naissance), P3 et P7 sur des coupes de cervelets congelés de $16\mu\text{m}$.

Comme on peut le voir sur la figure 1.1 les cellules en prolifération apparaissent en marron (révélation par la diaminobenzidine - DAB). Une contre coloration de toutes les cellules a également été faite en utilisant une coloration au crésyl violet (cellules bleues). Nous avons comparé la prolifération des cellules granulaires en établissant un index de prolifération défini comme le rapport entre les cellules en prolifération sur l'ensemble des cellules de la couche externe du cervelet à l'intérieur d'une zone de comptage identique pour tous les comptages. Pour plus de reproductibilité nous avons utilisé une fenêtre de comptage fixe et nous nous sommes toujours placés au niveau de la fissure primaire du cervelet.

Nous avons observé une réduction de l'index de prolifération de 32,6% dans la couche externe du cervelet chez les souris Ts1Cje à P0 mais pas à P3 ni à P7 (figure 1.2). Cette diminution est significative ($p < 0,001$) d'après le test de conformité de Student (t test). Ce résultat suggère donc un évènement précoce durant le développement du cervelet à l'origine de l'hypoplasie observée chez l'adulte.

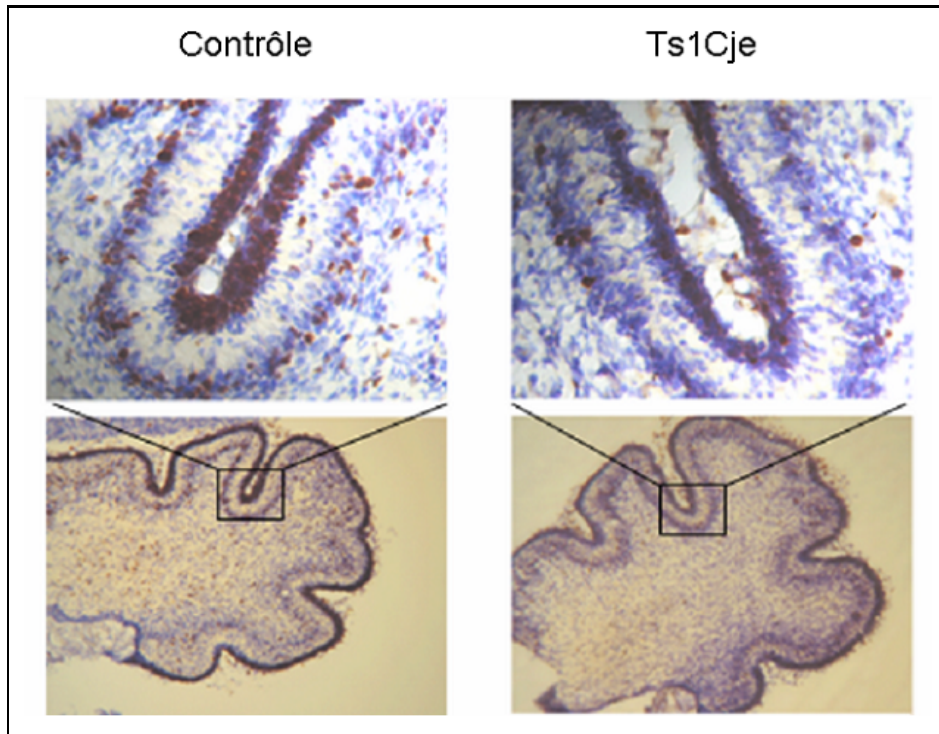


FIGURE 1.1: Marquage immunohistochimique d'une tranche de cervelet de souris Ts1Cje et contrôle avec l'anticorps anti-Ki67 (marron). La contre-coloration par le cresyl violet en bleu permet de distinguer l'ensemble des cellules.

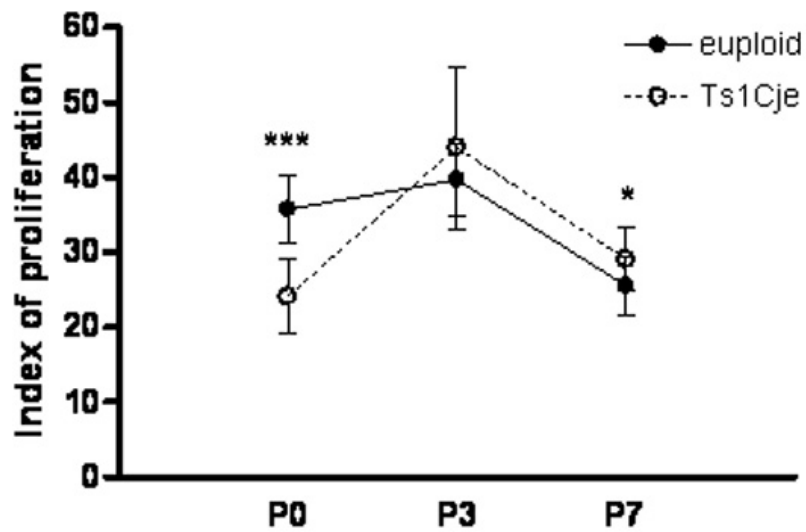


FIGURE 1.2: Index de prolifération dans la couche externe du cervelet à P0, P3 et P7 chez des souris Ts1Cje et contrôles. P-valeur inférieur à 0.05 (*) et 0.001 (***)

Pour savoir si cette réduction de la prolifération a lieu uniquement à la naissance ou si elle commence dès le stade embryonnaire nous avons également tenté d'étudier la prolifération des cellules granulaires à E17 soit 1 jour avant la naissance des souriceaux. A ce stade la couche externe du cervelet est très fragile. La figure 1.3 présentent des tranches de cervelet de souris Ts1Cje et contrôles marquées avec un anticorps dirigé contre la protéine Ki67 révélé par la DAB (cellules noires sur les photos). A E17, les fissures ne sont pas encore formées ou très peu, ce qui rend le choix d'une zone de comptage reproductible plus difficile (photo 1.3a). De plus comme on peut le voir sur les photos 1.3b et 1.3c, les coupes sont très fragiles, le tissu était souvent endommagé et sur une grande partie des tranches la couche externe se repliait sur elle même rendant le comptage impossible. De plus, les coupes présentaient une grande variabilité de marquage même quand elles étaient issues de souris de même génotype, souris Ts1cje (1.3c et 1.3d) ou contrôles (1.3e et 1.3f). Enfin, la largeur de la couche externe ainsi que la densité de marquage pouvaient être très variables sur une même coupe (exemple photo 1.3e). Pour toutes ces raisons, les comptages effectués sur 3 portées de souris Ts1Cje et contrôles ont été fait dans des zones et à des niveaux du cervelet différents selon les animaux. En conséquence les résultats présentent une grande variabilité et ne sont pas concordants selon les portées. Il ne nous a donc pas été possible de procéder à des comptages fiables et reproductibles au stade embryonnaire

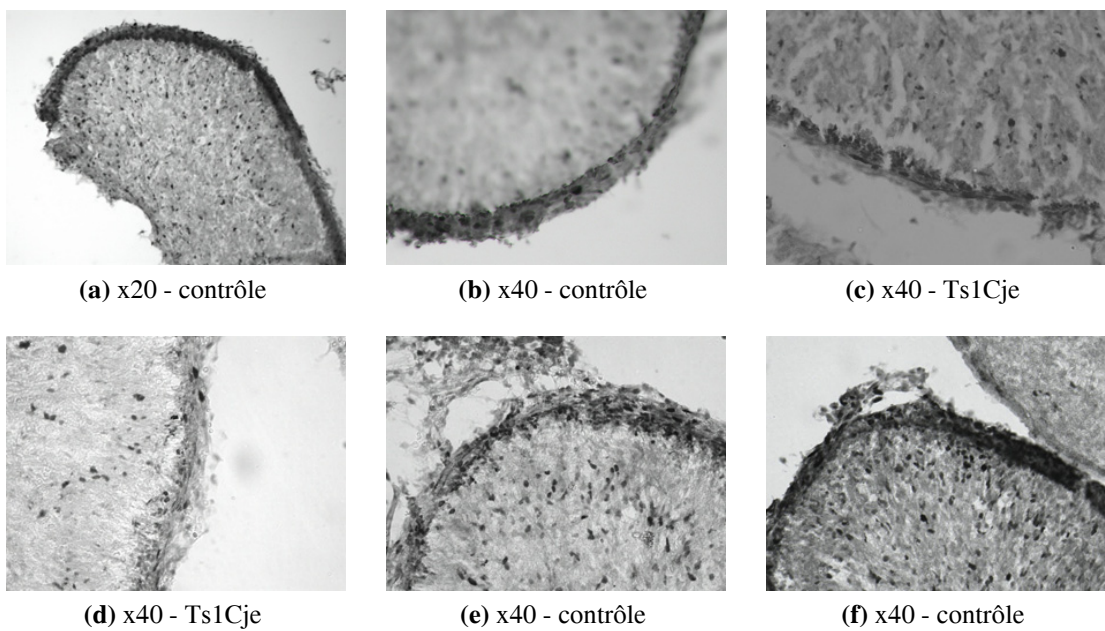


FIGURE 1.3: Coupes de cervelets de souris Ts1Cje (c,d) et contrôles (a,b,e,f) à E17 aux grossissements x20 ou x40.

Chapitre 2

Étude du transcriptome au cours du développement postnatal du cervelet.

Afin de trouver les gènes ou les réseaux de gènes impliqués dans l'hypoplasie du cervelet, nous avons analysé l'expression des gènes dans le cervelet de souris Ts1Cje et contrôles à P0, P3, P7 et P10 en utilisant des puces pangénomiques 2-couleurs (puces RNG/MRC fabriquées sur la plateforme d'Evry (Le Brigand et al., 2006, figure 2.1) contenant 25 344 sondes représentant environ 15 574 gènes murins.

L'objectif principal était de détecter les gènes différentiellement exprimés chez les souris Ts1Cje par rapport aux souris contrôles au cours du développement du cervelet. Pour cela nous avons utilisé 56 échantillons d'ARN extraits de cervelets individuels de souris Ts1Cje et contrôles. Nous avons utilisé 28 puces pangénomiques 2-couleurs. Afin de maximiser la significativité de nos résultats nous avons toujours co-hybridé un échantillon Ts1Cje avec un échantillon contrôle car ce sont les modifications du transcriptome chez les individus Ts1Cje que nous souhaitons mettre le plus en évidence. De plus, afin de pouvoir comparer au mieux les échantillons co-hybridés, ces échantillons étaient issus soit de souris du même âge, soit de souris avec au maximum 4 jours de différence (P0 versus P3, P3 versus P7 ou P7 versus P10). En effet, aux temps choisis le cervelet est en plein développement et comparer des échantillons trop différents risque de conduire à des données non interprétables (par exemple dans le cas de gènes exprimés à un stade mais pas à un autre). Enfin, notre plan expérimental a tenu compte des différences de signal

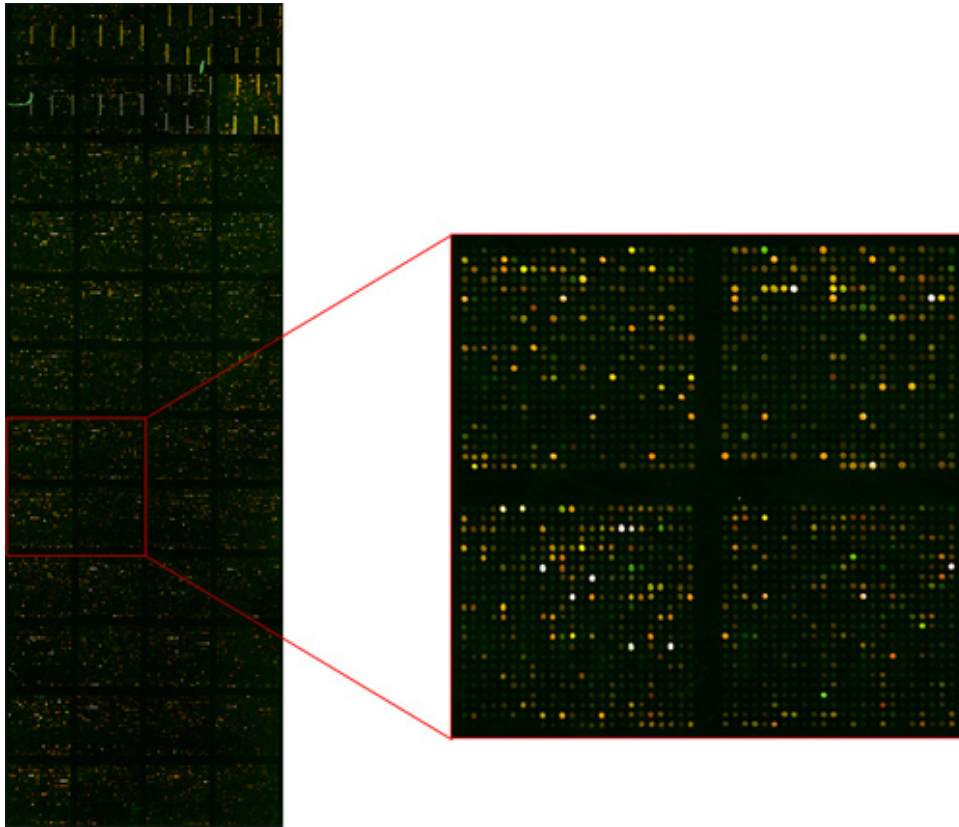


FIGURE 2.1: Image de la superposition des signaux Cy3 et Cy5 d'une puce à ADN RGN/MRC.

qui peuvent provenir de l'utilisation de 2 fluorophores (cy3 et cy5) en répartissant équitablement le nombre d'échantillons Ts1Cje et contrôles marqués avec chacun de ces 2 fluorophores.

Le plan expérimental est schématisé sur la figure 2.2. Il a été élaboré en collaboration avec Isabelle Rivals (Equipe de Statistique Appliquée - ESPCI) qui a également participé à la mise au point des tests statistiques utilisés dans ce projet.

La lecture de ces lames par un scanner permet donc d'obtenir 2 signaux correspondant aux 2 fluorophores. Nous avons choisi de travailler sur le rapport de ces signaux et non sur les signaux eux-mêmes. Cela présente l'avantage de comparer des échantillons qui ont été hybridés sur une même lame et donc dans les mêmes conditions, réduisant ainsi les biais expérimentaux. De plus, cela permet de comparer les rapports obtenus sur différentes lames sans procéder préalablement à une normalisation inter-lame. Par contre, une normalisation de chaque lame est nécessaire.

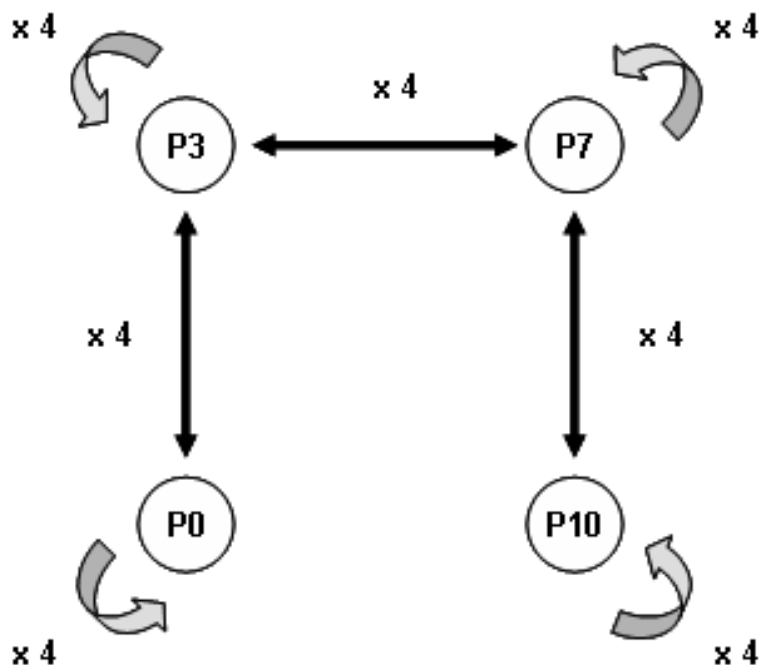


FIGURE 2.2: Plan expérimental. Sur chaque lame nous avons hybridé 2 échantillons, un trisomique et un contrôle, du même âge ou d'âge proche (P0vsP3, P3vsP7 et P7vsP10). Chaque combinaison a été faite en 4 répliques en interchangeant les fluorophores (dye swap).

Le logiciel Genepix que nous avons utilisé pour extraire les données des images de puces permet de repérer de façon automatique chaque spot (chaque sonde sur la puce) afin d'évaluer le signal et le bruit de fond qui l'entoure. Cependant, le manque d'efficacité de l'algorithme ainsi que les défauts de fabrication présents dans notre lot de puces (lignes de spots qui se croisent ou lignes de spots trop proches) nous ont obligés à réaligner manuellement tous les spots sur chaque puce.

Le logiciel permet également de différencier les spots dits 'allumés', c'est à dire présentant un signal de fluorescence, et les spots dits 'éteints'. Concernant l'étape de normalisation nous avons choisi de prendre en compte le signal de tous les spots, allumés et éteints, car nous considérons qu'ils sont tous informatifs. Cela permet également de normaliser chaque puce en fonction des mêmes sondes. Cependant nous avons écarté de la normalisation les spots non informatifs tels que les spots 'tampon' (sans sonde) ainsi que les spots correspondant à des sondes identiques présentes en plusieurs exemplaires. Par exemple, une sonde correspondant au gène *Actb* est présente sur la puce en près de 250

exemplaires répartis sur les 8 premiers cadrans de la puce. Nous avons considéré que ces sondes pouvaient biaiser la normalisation. Nous les avons donc normalisés séparément en utilisant les courbes de corrections appliquées aux autres spots et en respectant leur cadran d'origine.

Comme nous l'avons dit, Genepix évalue le bruit de fond environnant chaque spot. Le but étant de soustraire ce bruit de fond local du signal émis par le spot. Cette procédure semble logique, cependant, comme le montre l'exemple de la figure 2.3, nous avons constaté que le retrait du bruit de fond induisait une augmentation de la variabilité des rapports de signaux. Cela se voit aussi bien sur les graphiques M/A que sur les box-plots représentant les valeurs médianes et les écarts des rapports des signaux dans chaque cadran. La définition du graphique M/A est donnée à la page suivante. Nous avons également testé l'égalité des moyennes des intensités de chaque cadran (test F de Fisher). Si dans les 2 cas, les tests ne détectent pas de différence significative entre les 48 cadrans, la valeur du Fisher est nettement plus faible lorsque l'on soustrait le bruit de fond.

Enfin, les rapports de signaux présentent une distribution asymétrique qui ne satisfait pas aux conditions nécessaires à l'application des lois statistiques. En effet, lorsqu'un ARNm est présent en plus petite quantité dans l'échantillon Ts1Cje par exemple, le rapport des signaux va être compris entre 0 et 1. S'il est 2 fois moins présent dans un échantillon Ts1Cje son rapport sera de 0,5. Au contraire, si cet ARNm est présent en plus grande quantité dans un échantillon Ts1Cje, le rapport des signaux sera supérieure à 1 et sans borne supérieure. Par exemple s'il est 2 fois plus exprimé dans un échantillon Ts1Cje, son rapport sera égale à 2. Graphiquement, cela se traduit par une distribution asymétrique non centrée sur sa moyenne comme on peut le voir sur la figure 2.4. Pour palier cette difficulté, nous avons transformé les rapports d'expression par la fonction \log_2 . Cette transformation permet de rétablir la symétrie de la distribution (figure 2.4). En effet, dans le cas d'un ARNm 2 fois moins exprimé dans un échantillon Ts1Cje, son rapport d'expression sera égal à $\log_2(\frac{1}{2}) = -1$ et dans le cas contraire son rapport sera égal à $\log_2(\frac{2}{1}) = 1$. De plus comme on le voit sur la figure 2.4, la distribution n'est plus centrée

autour de 1 mais de $\log_2(1) = 0$.

Comme le montre les courbes de distribution des rapports d'expression des 28 puces à ADN de la figure 2.5, après transformation en \log_2 des rapports des signaux et normalisation par LOWESS de chaque lame nous avons obtenu un ensemble de données centrées sur 0 et présentant une distribution proche d'une distribution gaussienne.

Une normalisation de chaque lame a été nécessaire. En effet, il peut exister des petites différences dans la quantité de chaque échantillon hybridé dues soit à l'expérimentateur soit à l'efficacité de la reverse transcription par exemple. Les procédures de normalisation classiques telles que la normalisation par la moyenne permettent d'obtenir des intensités moyennes des signaux identiques pour les 2 individus. Cependant, les rapports des signaux ne varient pas tous de la même façon selon l'intensité du signal. En effet, les signaux de faible intensité ont tendance à varier beaucoup plus que les signaux de forte intensité. Cela se voit clairement sur un graphique 'M/A' représentant les rapports des signaux en fonction de la moyenne des intensités de ces signaux en \log_2 (figure 2.6).

Les valeurs A et M, respectivement en abscisse et en ordonnée, sont définis tel que :

$$\begin{cases} A = \frac{1}{2} \times [\log_2(Cy5) + \log_2(Cy3)]. \\ M = \log_2(Cy5) - \log_2(Cy3) \end{cases} \quad (2.1)$$

Afin de normaliser nos données, nous avons choisi d'utiliser un algorithme de lissage appelé LOWESS ('locally weighted scatterplot smoothing') qui tient compte des effets de l'intensité des signaux sur les ratios en lissant les points situés dans une fenêtre qui se déplace le long de l'axe des abscisses sur un graphique M/A. Cette procédure repose sur l'hypothèse que l'expression de la majorité des gènes chez les 2 individus testés sur une puce doivent être proches. En conséquence, l'algorithme s'applique à centrer les rapports d'expression autour de 0 (car les valeurs sont en \log_2).

Sur la figure 2.6-A, les nuages de points noirs représentent les données d'une puce à ADN avant et après normalisation sur un graphique MA ('MA plot'). Les courbes de

correction faites par le LOWESS sont représentées en vert.

Comme on peut le voir sur la figure 2.1, chaque puce est composée de 48 cadrans contenant chacun environ 500 sondes. Nous avons choisi de procéder à une normalisation par cadran et non pas à une normalisation globale de la puce car il peut exister des disparités fortes entre certaines régions de la puce. La figure 2.6-B représente sous forme de 'box plot' les moyennes des rapports d'intensité des 48 cadrans d'une puce avant et après normalisation. Nous avons volontairement choisi une puce dont les rapports sont clairement centrés sur des valeurs négatives. Cette puce n'est pas représentative mais elle permet de visualiser le centrage des moyennes des rapports de chaque cadran autour de 0 après la normalisation. Enfin on peut voir sur la figure 2.6-C l'histogramme des rapports d'intensité de l'ensemble de la puce, après normalisation les rapports sont bien centrés autour de 0.

Nous avons testé l'ordre du polynôme utilisé pour la régression (0,1 ou 2) ainsi que le degré de lissage ('span' ou paramètre alpha, entre 0 et 1) qui peuvent être ajustés manuellement. Comme on peut le voir sur la figure 2.7, quelque soit le degré du polynôme (0 et 1) et le degré de lissage (0.05, 0.1, 0.2 et 0.3) la normalisation des données donne des résultats identiques. Nous avons donc choisi de normaliser les données en utilisant les valeurs par défaut proposées par le logiciel R : un polynôme de degré 2 et un degré de lissage de 0.75).

Afin de distinguer et d'estimer les modifications de l'expression des gènes dues à la présence de gènes en 3 copies ('effet trisomie') et celles qui ont lieu au cours du développement normal du cervelet ('effet développement') nous avons procédé à une analyse de la variance (ANOVA) de nos données. Contrairement à ce que suggère son nom, l'ANOVA est une méthode statistique qui permet d'étudier les différences de moyennes de plusieurs populations et non les différences de variances. C'est en quelque sorte une généralisation du test de Student (t test) appliquée à n populations ($n > 2$). Notre paramétrisation de l'ANOVA a donc considéré 2 facteurs : l'effet trisomie (2 modalités : Ts1Cje ou contrôle) et l'effet développement (4 modalités : P0, P3, P7 ou P10). Nous avons consi-

déré que ces 2 facteurs étaient responsables de la totalité de la variance dans l'expression des gènes autour d'une valeur moyenne μ . L'effet dû au développement est noté α_i et l'effet dû à l'état trisomique est noté β_i (table 2.1). Nous avons ainsi pu pour chaque gène établir si son expression est différente chez les souris Ts1Cje et s'il est régulé au cours du développement.

	P0	P3	P7	P10
Contrôles	μ	$\mu + \alpha_3$	$\mu + \alpha_7$	$\mu + \alpha_{10}$
Ts1Cje	$\mu + \beta_0$	$\mu + \alpha_3 + \beta_3$	$\mu + \alpha_7 + \beta_7$	$\mu + \alpha_{10} + \beta_{10}$

TABLE 2.1: Paramétrisation de l'ANOVA.

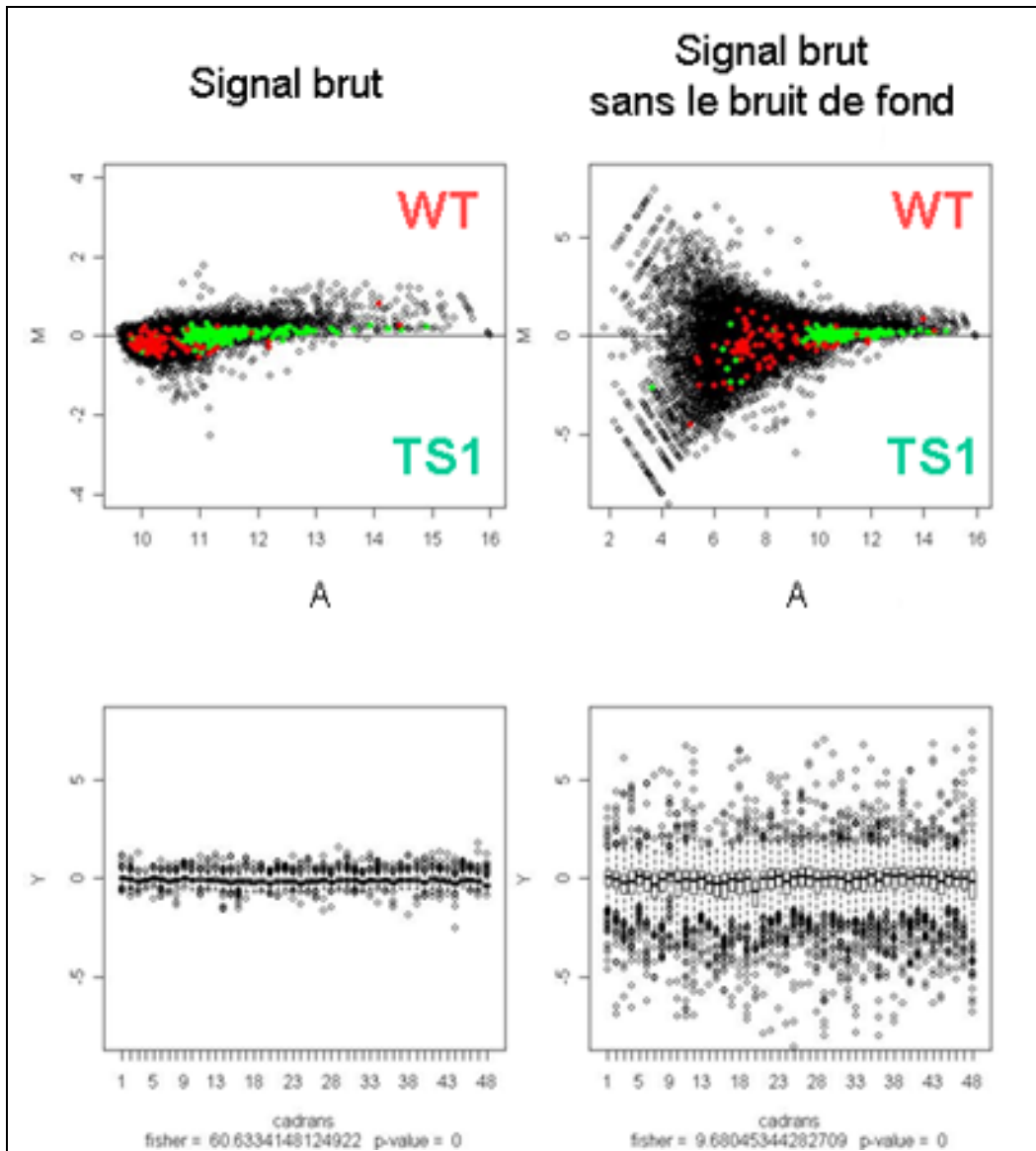


FIGURE 2.3: Effet du bruit du fond sur les rapports des signaux. Les graphiques M/A considèrent l'ensemble des signaux d'une puce et les boxplots présentent les médianes et la dispersion des rapports selon chaque cadran. L'égalité des moyennes des cadrans a été vérifiée en utilisant le test de Fisher. En vert sont représentées les sondes correspondant au gène *Actb* et en rouge les sondes correspondant aux gènes en 3 copies.

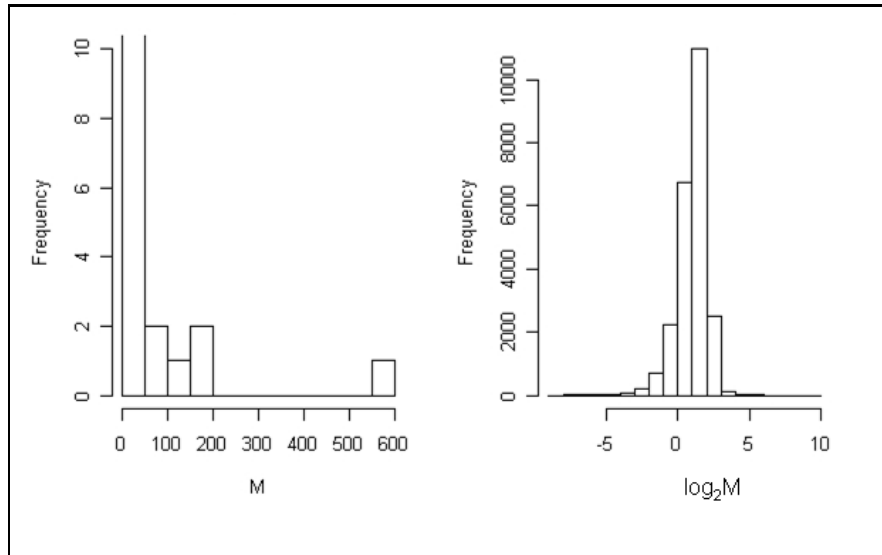


FIGURE 2.4: Symétrisations des rapports des signaux par transformation en \log_2 . L'histogramme des rapports des signaux brut d'une puce à ADN, à gauche, est asymétrique. Celui des données transformées en \log_2 est symétrique et centré autour de 0.

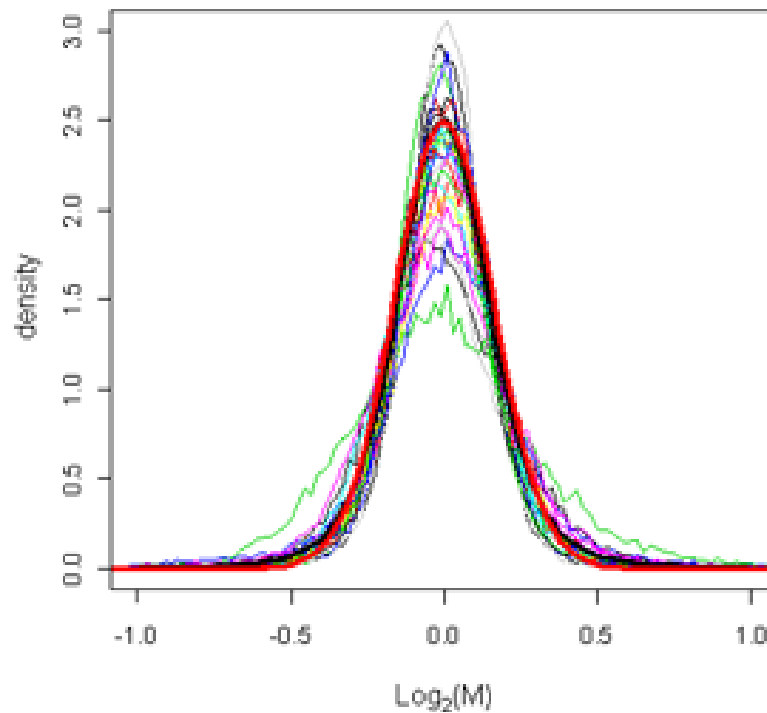


FIGURE 2.5: La transformation et la normalisation des données permettent de travailler sur des distributions comparables et proches d'une distribution gaussienne. En rouge et en gras est représentée une courbe de Gauss, en couleurs et en trait fin sont représentées les distributions des rapports des 28 puces.

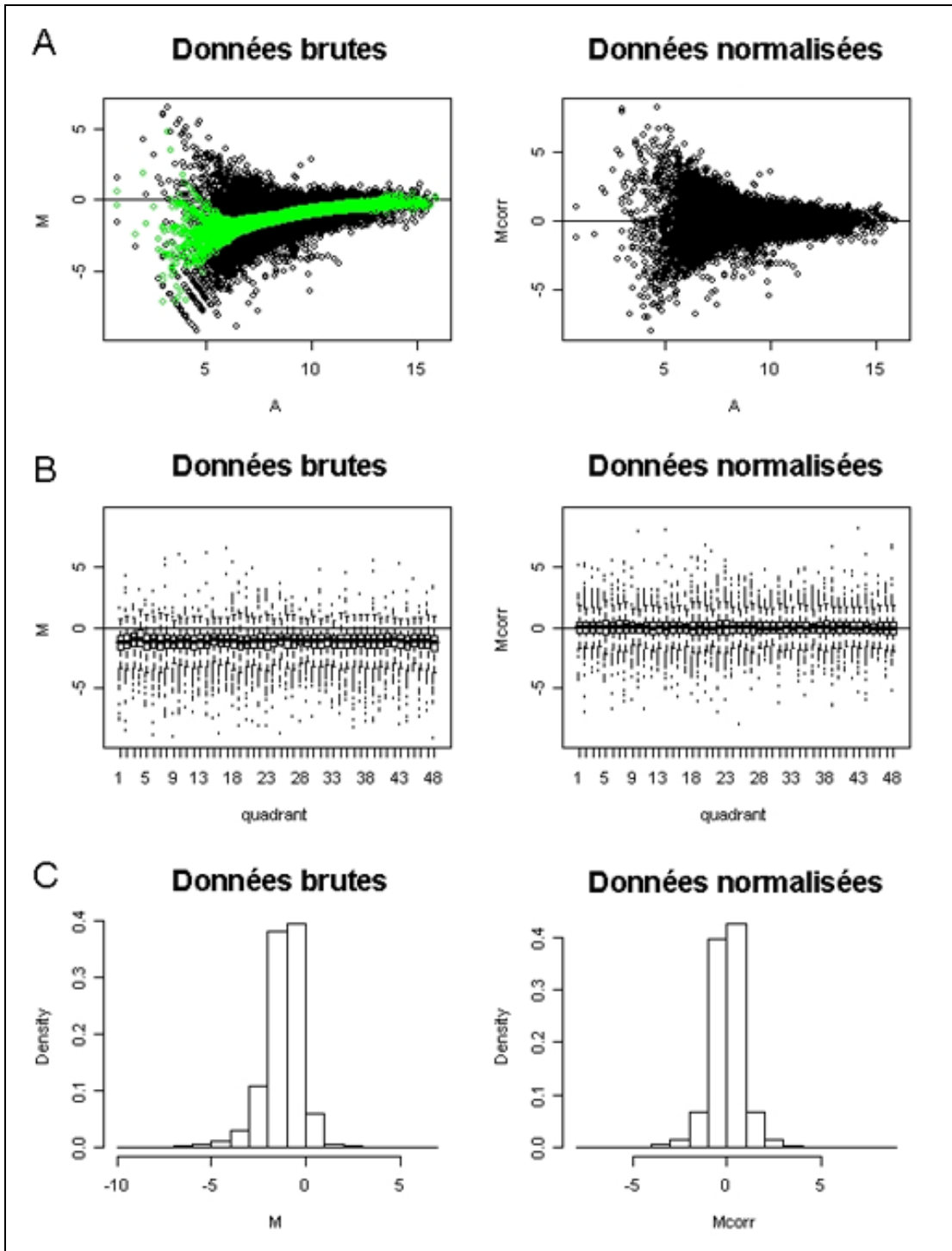


FIGURE 2.6: Représentation des rapports d'expression d'une puce avant et après normalisation par LOWESS. (A) graphique MA, en vert les corrections du LOWESS, (B) boxplot par cadran, (C) histogramme des M.

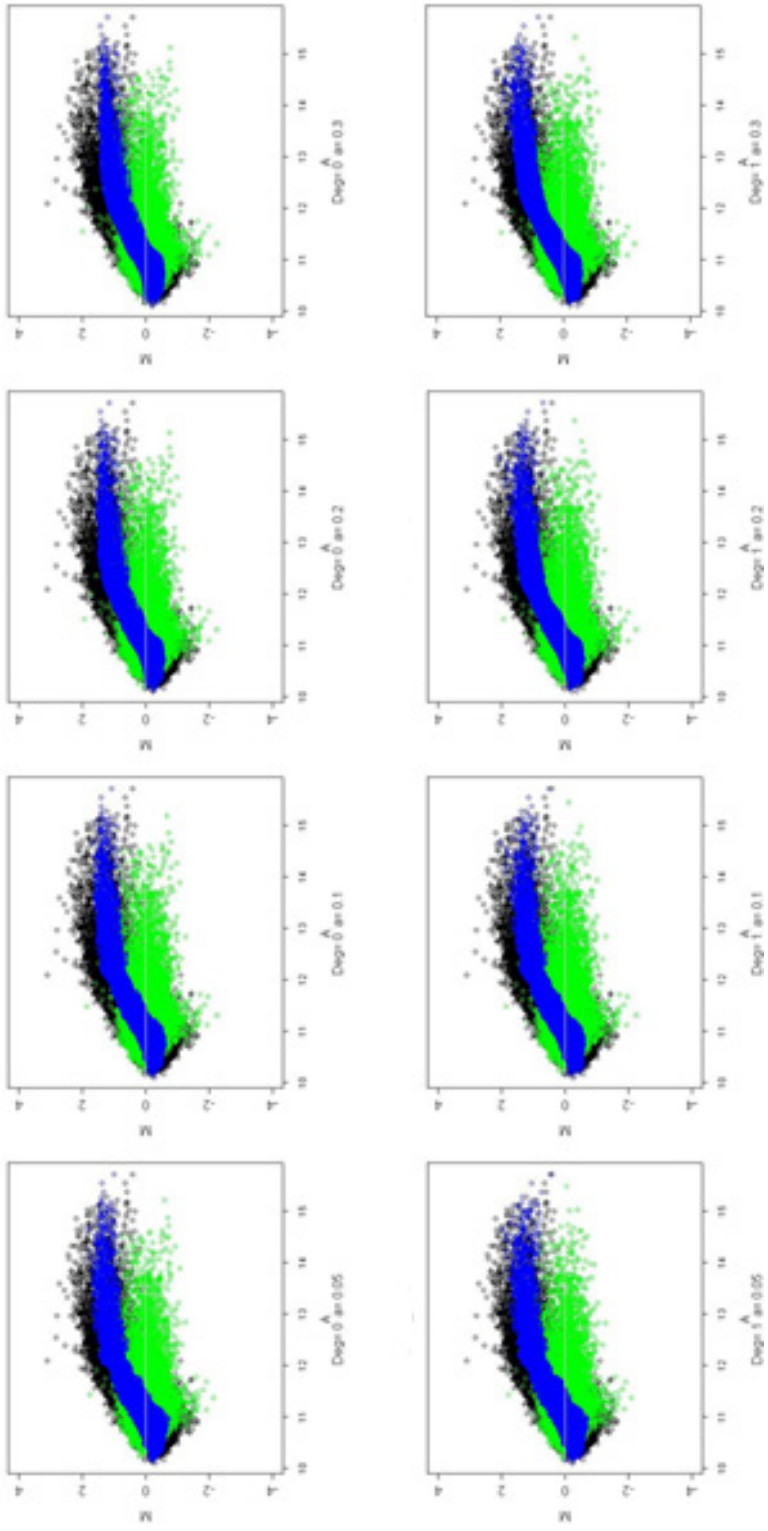


FIGURE 2.7: Test de l'efficacité des paramètres du LOWESS sur les données d'une puce à ADN. En noir, les données brutes, en bleue les courbes de correction du LOWESS et en vert les données normalisées. Les corrections ont été effectuées avec un polynôme de degré 0 (1^{ère} ligne) ou de degré 1 (2^{ème} ligne). Les degrés de lissage testés sont de gauche à droite : 0.05, 0.1, 0.2 et 0.3

2.1 Les modifications du transcriptome chez la souris Ts1Cje.

L'ANOVA, qui repose sur les statistiques de Fisher, nous a permis de trouver que 372 à 1164 gènes sont différentiellement exprimés de manière significative dans le cervelet des souris Ts1Cje par rapport aux souris contrôles (table 2.2). Ces gènes représentent environ entre 2.4% et 7.5% des gènes exprimés et présents sur la puce. Dans cette expérience, nous avons considéré qu'un gène est exprimé lorsque le signal émis par une sonde est supérieur à $1.3 \times$ le bruit de fond autour de cette sonde.

	'Effet trisomie'				'Effet développement'		
	P0	P3	P7	P10	P0→P3	P0→P7	P0→P10
Gènes exprimés	15458	15552	15574	15463	15368	15565	14208
Gènes 2N différentiellement exprimés	824	1164	372	532	1476	1930	1592
Gènes 3N différentiellement exprimés	11	13	12	11	4	3	2

TABLE 2.2: Nombre de gènes différentiellement exprimés au cours du développement postnatal du cervelet chez la souris Ts1Cje ('effet Trisomie') et au cours du développement normal du cervelet ('effet développement') obtenus par ANOVA ($\alpha = 5\%$). Gènes 2N : gènes en 2 copies ; Gènes 3N : gènes en 3 copies.

Afin de contrôler le taux de faux positifs (type d'erreur I) qui peut être important dans ce type de test à comparaisons multiples nous avons voulu appliquer un test de correction appelé 'False Discovery rate' (FDR). Ce test, appliqué aux p-valeurs obtenues par le test de comparaison (ici l'ANOVA), permet d'obtenir la liste des gènes les plus significativement régulés.

Nous avons utilisé l'algorithme de Benjamini et Hochberg (Benjamini and Hochberg, 1995) définit tel que :
$$\begin{cases} p_m^{\text{BH}} = p_m \\ p_i^{\text{BH}} = \min(p_{i+1}^{\text{BH}}, \frac{mp_i}{i}) \end{cases}$$
 pour $i = m-1$ to 1, où m est le nombre de tests et i le rang de chaque p-valeur dans l'ordre ascendant.

Malheureusement ce test s'est montré trop stringent pour nos données et n'a retenu aucun gène significatif. Nous avons essayé de modifier les paramètres du test de Benjamini et Hochberg afin de le rendre plus tolérant mais sans succès (notamment en estimant

le taux de ‘vrai positifs’ par l’analyse des distributions des p-valeurs de l’ANOVA). Nous avons donc conclu que ces tests étaient inapplicables à nos données et nous n’avons tenu compte que des résultats de l’ANOVA.

Lorsque l’on regarde les résultats de l’ANOVA, non corrigés par le FDR et donc à priori sur-estimés, on remarque qu’une minorité des gènes exprimés sont spécifiquement régulés chez les souris Ts1Cje suggérant que la trisomie ne provoque pas de déstabilisation globale du transcriptome dans le cervelet des souris Ts1Cje.

Afin de dégager des groupes de gènes impliqués dans une ou des fonctions communes nous avons soumis nos listes de gènes différentiellement exprimés au logiciel eGOn V2.0 (eGon - explore GeneOntology, www.genetools.microarray.ntnu.no) (Rivals et al., 2007; Beisvag et al., 2006). Ce logiciel en ligne recherche les processus biologiques (ontologies) dans lesquels sont impliqués les gènes différentiellement exprimés et les compare à l’ensemble des gènes représentés sur la puce à ADN. Le logiciel fournit ensuite la liste des processus biologiques qui sont enrichis ou déplétés parmi les gènes différentiellement exprimés.

Pour rechercher les ontologies de chaque gène, le logiciel s’appuie sur la base de données ‘Gene Ontology’ (www.geneontology.org) qui développe une structure arborisée, hiérarchisée, des différentes ontologies qui décrivent un gène en terme de processus biologiques, de localisations cellulaires et de fonctions moléculaires dans différentes espèces. La figure 2.8 illustre un exemple d’une telle arborisation.

La liste complète des processus biologiques pour chaque stade de développement est disponible en annexe (annexe A page 149 (P0), 150 (P3), 151 (P7) et 152 (P10)). Nous avons retrouvé un enrichissement des processus biologiques liés au développement à tous les temps ainsi qu’un enrichissement de processus biologiques liés au cycle cellulaire à P0, P3 et P10. De manière surprenante, parmi ces processus liés au cycle cellulaire, six concernent l’apoptose (à P0 et à P3). Nous avons également mis en évidence des enrichissements de processus biologiques impliqués dans la régulation des gènes (transcription,

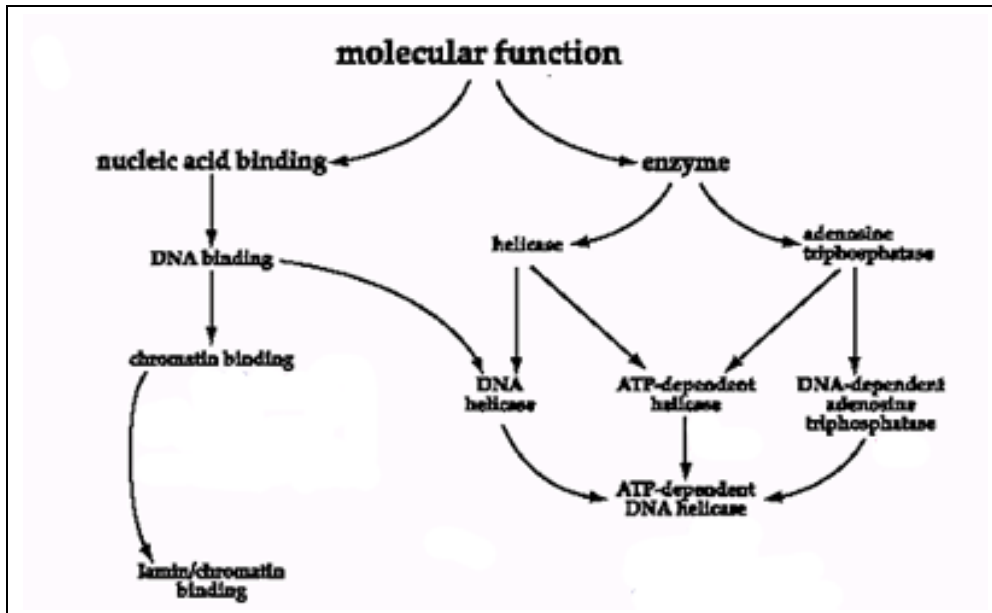


FIGURE 2.8: Illustration de l'arborisation des ontologies dans la base de données des GO (Ashburner et al., 2000).

formation de la chromatine, transport des ARN, spliceosome et méthylation) à tous les temps durant le développement.

Nous avons également cherché les gènes constamment dérégulés au cours du développement du cervelet chez les souris Ts1Cje et nous n'avons trouvé que 13 gènes (table 2.3) dont 12 sont surexprimés. Parmi ces gènes, 6 sont présents en 3 copies chez les souris Ts1Cje dont *Son* ou 'Son cell proliferation protein' qui a déjà été avancé comme gène candidat de l'hypoplasie cérébelleuse chez les souris Ts1Cje (Potier et al., 2006) mais n'a encore pas été étudié.

Symbole	P0	P3	P7	P10
<i>Atp5o</i>	1.27	1.26	1.59	1.46
<i>Ifngr2</i>	1.26	1.51	1.28	1.47
<i>Girk2</i>	1.21	1.40	1.31	1.30
<i>Pcp4</i>	1.50	1.41	1.70	1.53
<i>Sod1</i>	1.56	1.43	1.89	1.64
<i>Son</i>	1.32	1.48	1.60	1.53

TABLE 2.3: Liste des gènes différentiellement exprimés à P0, P3, P7 et P10 dans le cervelet des souris Ts1Cje. Tous les rapports sont significatifs (p -valeur < 0.05). Les gènes en 3 copies sont représentés en gras.

2.2 Les gènes impliqués dans développement du cervelet.

Entre P0 et P3, P0 et P7 et P0 et P10, nous avons respectivement trouvé 1476, 1930 et 1592 gènes différentiellement exprimés ce qui représente environ 9.6 à 12.4% des gènes exprimés aux différents stades du développement (table 2.2). Comme cela avait été montré dans une précédente étude du transcriptome entre P0 et P30 : un plus grand nombre de gènes est régulé au cours du développement normal du cervelet que le nombre de gène spécifiquement sous- ou surexprimés chez les souris Ts1Cje par rapport aux souris contrôles (Dauphinot et al., 2005).

La prépondérance de l'effet du développement par rapport à l'effet de la Trisomie sur l'expression des gènes se voit nettement par l'analyse en composantes principales (ACP) des données d'expression des 56 souris. L'ACP est une méthode statistique descriptive qui permet de visualiser sur un repère à 2 dimensions des individus définis par des milliers de variables. Les 2 axes du graphique, ou composantes principales, reflètent le degré de variance dans les données. Sur la figure 2.9 on peut observer une APC sur laquelle sont représentées les souris Ts1Cje et contrôles à P0, P3, P7 et P10. Ces souris sont ici définies par l'expression de l'ensemble des gènes représentés sur les puces dans le cervelet. Comme nous avons travaillé sur des rapports de signaux et non sur les signaux eux-mêmes, nous avons dû extraire les données d'expression individuelles à partir des rapports normalisés : les valeurs M et A. En s'appuyant sur la définition de ces 2 variables (équation 2.1 page 77) nous avons défini les individus ainsi :

$$\begin{cases} \text{individu Ts1Cje} = A + \frac{1}{2} \times M \\ \text{individu contrôle} = A - \frac{1}{2} \times M \end{cases} \quad (2.2)$$

Nous avons choisi de regrouper les souris en 8 classes : souris Ts1Cje et contrôles à P0, P3, P7 et P10. Chaque groupe est défini par la moyenne de l'expression des gènes des 6 ou 8 souris appartenant à chacun de ces groupes. Comme le montre la figure 2.9, ces 'individus moyens' se regroupent par stade de développement et non par génotype. Ce

résultat illustre l'importance du développement sur l'expression des gènes par rapport à l'état trisomique.

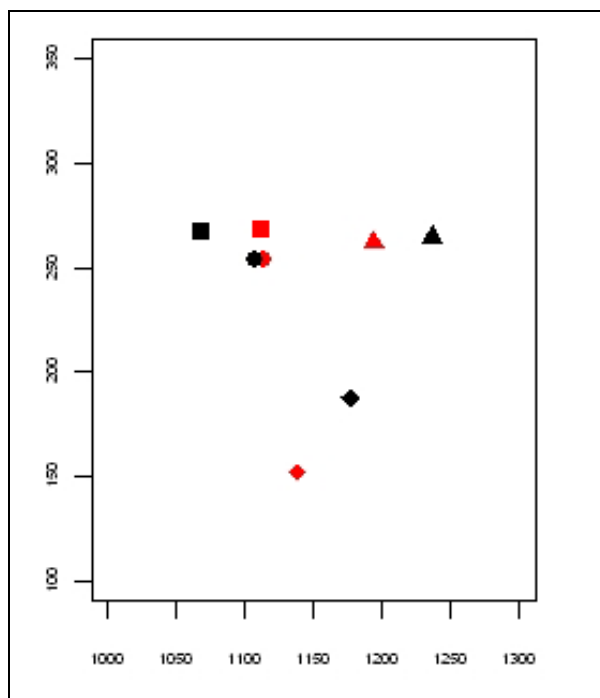


FIGURE 2.9: Analyse en composantes principales des souris Ts1Cje (en rouge) et contrôles (en noir) à P0 (cercles), P3 (carrés), P7 (triangles) et P10 (losanges).

Cependant, nous avons trouvé un grand nombre de gènes (1187) régulés durant le développement du cervelet et différemment exprimés chez les souris Ts1Cje à au moins un stade du développement. Parmi ces gènes, seulement 3 sont présents en 3 copies chez les souris Ts1Cje : *Girk2*, *Olig1* et *Dscam* (table 2.4). *Girk2* est le seul gène en 3 copies régulé durant le développement du cervelet et surexprimé aux 4 stades étudiés chez les souris Ts1Cje. *Girk2* connu également sous le nom de *kcnj6* code pour une sous-unité d'un canal potassium voltage dépendant présent dans les cellules granulaires du cervelet (Aguado et al., 2007). Ce gène est bien connu car sa mutation dans une lignée murine, la souris 'weaver' (wv), provoque la dégénérescence des cellules granulaires du cervelet (Harkins and Fox, 2002). *Olig1* est un facteur de transcription impliqué dans le destin neuronal des cellules (Ligon et al., 2006) et *Dscam* est un récepteur de surface impliqué dans l'adhésion cellulaire (Schmucker, 2007).

	'Effet trisomie'				'Effet développement'		
	P0	P3	P7	P10	P0→P3	P0→P7	P0→P10
<i>Girk2</i>	1.21	1.40	1.31	1.29	1.50	3.31	3.11
<i>Olig1</i>	1.47	ns	1.34	ns	1.88	ns	ns
<i>Dscam</i>	ns	1.41	ns	ns	0.76	ns	ns

TABLE 2.4: Liste des gènes en 3 copies régulés durant le développement du cervelet et surexprimés chez les souris Ts1Cje. NS : non significatif.

2.3 Les gènes impliqués dans la prolifération des cellules granulaires.

Afin d'identifier des voies impliquées dans le développement du cervelet et modifiées chez les souris Ts1Cje nous avons analysé l'expression d'une sélection de 22 gènes chez 6 souris Ts1Cje et 6 souris contrôles à P0 par PCR quantitative. Ces 22 gènes ont été choisis car ils sont connus pour être soit impliqués dans la prolifération et la différenciation des cellules dans le cervelet, soit directement impliqués dans l'hypoplasie cérébelleuse chez des souris trisomiques (revue dans Moldrich, 2007; Sotelo, 2004). Il s'agit principalement des voies de signalisation Notch (Solecki et al., 2001) et Shh (Sonic hedgehog) (Ruiz i Altaba et al., 2002), de facteurs de transcription tels que *Nfat1* et *Nfat5* (Arron et al., 2006) ou *Rcan1* impliqués dans la régulation du signal calcique (Harris et al., 2005). Nous avons également vérifié l'expression de *Son* et *Hmgn1*, 2 gènes en 3 copies qui ont déjà été proposés comme gène candidat pour l'hypoplasie cérébelleuse chez les souris Ts1Cje (Potier et al., 2006).

Comme on peut le voir sur la figure 2.10, seuls les gènes en 3 copies sont sensiblement et significativement surexprimés avec des rapports d'expression supérieurs à 1,5 entre les souris Ts1Cje et les souris contrôles à P0. Parmi les gènes en 2 copies, seuls *Shh* (rapport = 1.16) et son récepteur *Ptch1* (rapport = 1.08) sont légèrement mais significativement surexprimés.

Cette analyse du cervelet de la souris Ts1Cje au cours du développement postnatal n'a pas permis de mettre en évidence des modifications sensibles parmi les principales voies de

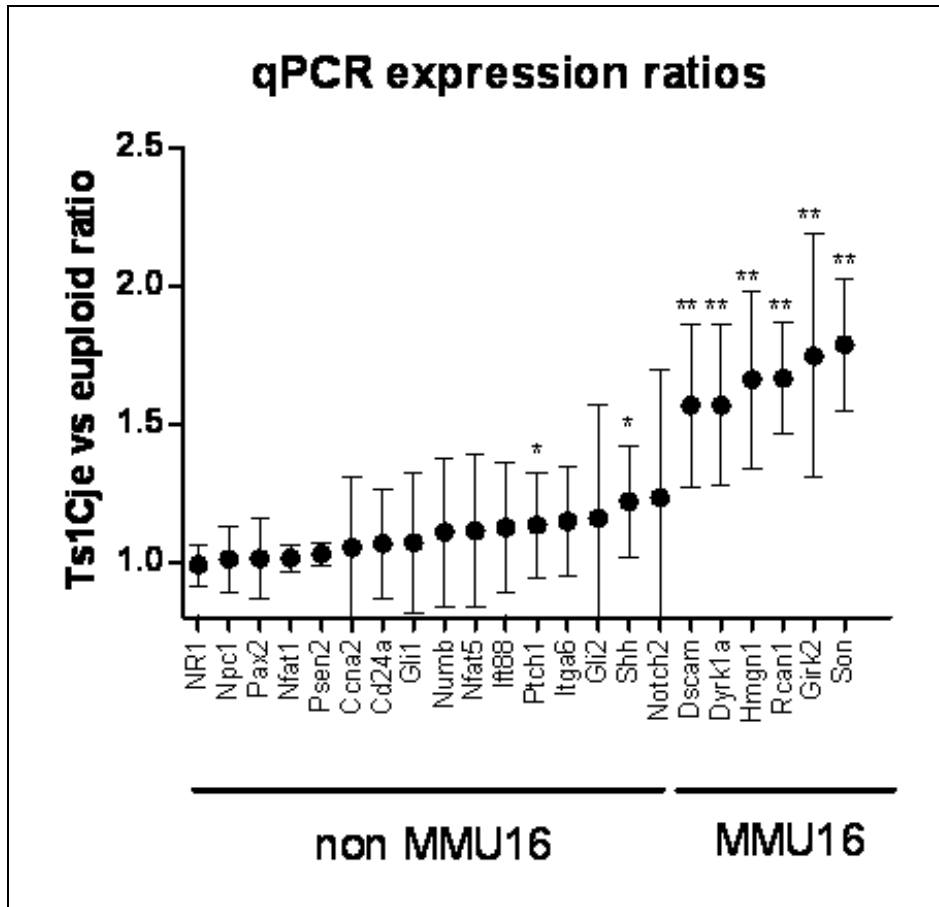


FIGURE 2.10: Rapports d'expression de 22 gènes candidats dans le cervelet de souris Ts1Cje et contrôles à P0 obtenus par PCR quantitative. Les gènes sont ordonnés par ordre croissant des rapports. (* $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$; t -test).

signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire. Nous avons par contre confirmé la surexpression de gènes candidats pour l'hypoplasie du cervelet et présent en 3 copies chez la souris Ts1Cje : *Hmgn1* et *Son* (Dauphinot et al., 2005; Potier et al., 2006). Nous avons en outre identifié un gène : *Girk2* régulé durant le développement du cervelet et constamment surexprimé chez les souris Ts1Cje. Ce gène a de plus déjà été impliqué dans la survie des cellules granulaires. Une réflexion plus approfondie sur les gènes candidats et *Girk2* en particulier est développée au chapitre 4 de la discussion page 134.

Chapitre 3

Étude du transcriptome de la couche externe à la naissance.

Afin d'analyser les variations de l'expression des gènes dans la région et au temps précis où nous avons mis en évidence une diminution sensible de la prolifération dans le cervelet, nous avons disséqué la couche granulaire externe des cervelets de 9 souris Ts1Cje et 9 souris contrôles à P0 provenant de 3 portées. Les dissections des couches granulaires externes ont été faites avec l'aide de Tania Vitalis (Neurobiologie - ESPCI) et Rosine Wehrle (UPMC - CNRS UMR 7102).

Cette seconde étude du transcriptome a été faite dans le cadre du consortium européen anEUploïdie dans lequel nous étions tenu d'utiliser des puces à ADN de type Affymétrie ou Illumina. Nous avons opté pour les puces à ADN de la société Illumina qui reposent sur la technologie dite 'Beadchip'. En effet, les sondes ne sont pas directement hybridées sur la puce comme dans le cas des puces RNg/MRC mais hybridées sur des micro-billes qui sont ensuite dispersées sur la puce. Cette technologie permet d'augmenter la précision du signal : chaque sonde est en moyenne présente sur environ 30 billes dispersées aléatoirement sur la puce. Le logiciel d'extraction des données analyse ces différentes billes et fournit une moyenne des signaux de fluorescence pour chaque sonde. De plus, le bruit de fond entre les billes est très fortement réduit et les billes sont parfaitement disposées sur la puce ce qui permet une analyse rapide par les logiciels. De plus, chaque lame contenant 6 puces, nous avons pu hybrider tous nos échantillons en parallèle réduisant ainsi les biais

d'expérience dans nos résultats.

Enfin, devant le succès croissant de la technologie des puces à ADN, des entreprises se sont créées offrant la possibilité de sous-traiter toutes les étapes d'amplification, de marquage et d'hybridation des échantillons. Si l'on ajoute à cela l'amélioration de la qualité de fabrication des puces ainsi que les meilleures performances des logiciels d'extraction des données, le temps passé à acquérir les données se trouve considérablement réduit.

Nous avons donc hybridé nos 18 échantillons d'ARN (9 échantillons Ts1Cje et 9 échantillons contrôles provenant de 3 portées) sur 3 lames Illumina. Sur chaque lame nous avons hybridé 3 échantillons Ts1Cje et 3 échantillons contrôles d'une même portée.

Nous avons procédé à une exploration de nos données afin de tester la robustesse de ces puces à ADN que nous utilisons pour la première fois dans notre laboratoire. Pour cela nous avons comparé 3 facteurs :

Le nombre de gènes exprimé sur chaque puce. La figure 3.1 représente le nombre de gènes trouvés exprimés sur les puce RNG/MRC d'une part et Illumina d'autre part. Les puces sont groupées en fonction des échantillons qui ont été hybridés dessus. Comme on le voit clairement, alors que les puces RNG/MRC présentent une forte hétérogénéité du nombre de gènes exprimés (entre 5% et 90%), les puces Illumina présentent un taux fixe d'environ 30% de gènes exprimés par rapport aux gènes représentés sur la puce. Il est vrai que les échantillons de la couche externe sont plus homogènes car ils sont tous issus de dissections de cervelets de souris à P0, cependant même les lames sur lesquelles ont été hybridés des échantillons issus de souris du même âge montrent une grande variabilité.

Concernant les puces Illumina, nous avons considéré qu'un gène était exprimé lorsqu'il présentait une p-valeur de détection inférieure à 1%. Cette p-valeur est calculée par le logiciel d'extraction des données d'Illumina. Elle témoigne de la différence entre les valeurs de signal des billes sur lesquelles sont greffées des sondes identiques et les valeurs de signal de billes sur lesquelles sont greffées des sondes non spécifiques mesurant ainsi le bruit de fond. Nous avons testé plusieurs valeurs,

de 0,05 à 0,0001 afin de voir combien de gènes étaient alors considérés comme exprimés et pour étudier l'incidence de ce choix sur la distribution des p-valeurs associées au *t* test et à la procédure de Benjamini et Hochberg. Nous n'avons observé aucun effet sur ces 2 distributions et nous avons choisi une p-valeur de détection d'expression de 1% car elle nous permet de retenir un nombre de gènes exprimés comparable à ce que l'on avait observé sur les puces RNG/MRC.

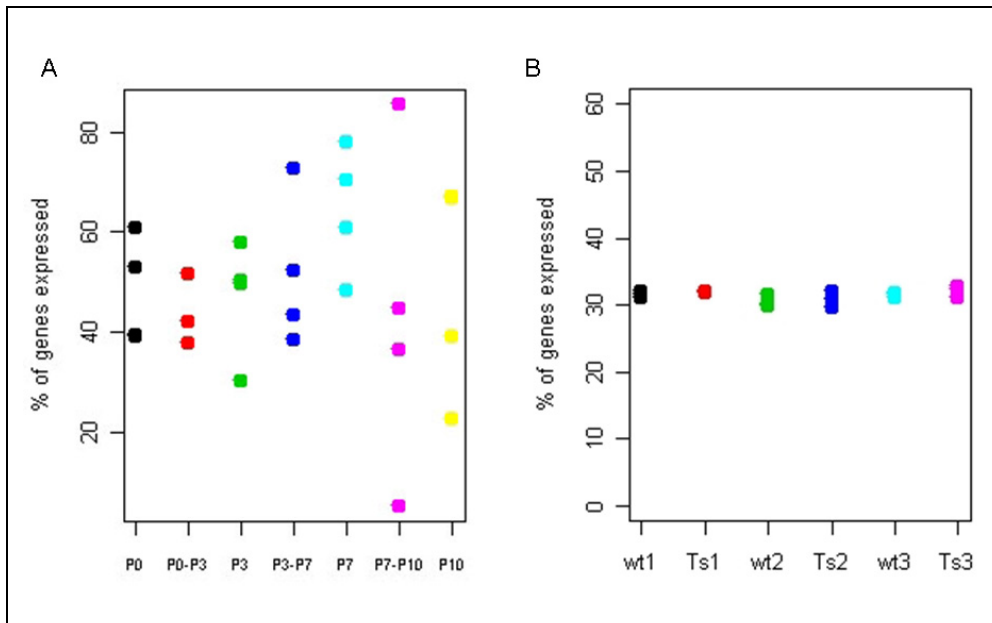


FIGURE 3.1: Proportions des gènes exprimés sur les puces RNG/MRC (A) et Illumina (B). Les puces sont regroupées en fonction des échantillons hybridés dessus.

La distribution des signaux. De même lorsque l'on regarde la distribution des signaux de fluorescence bruts (pas en \log_2) des 18 échantillons hybridés sur les puces Illumina, il apparaît que ces histogrammes sont déjà centrés autour d'une moyenne commune (figure 3.2).

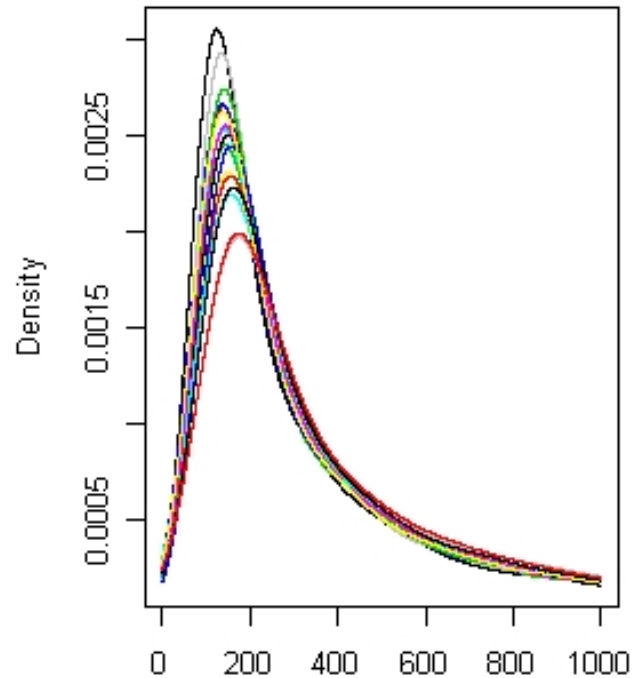


FIGURE 3.2: Histogramme des signaux bruts de fluorescences des 18 puces Illumina.

La corrélation des données. Enfin, afin de chiffrer cette homogénéité des données, nous avons calculé l'indice de corrélation entre chaque lame. Comme on le voit sur la figure 3.3, l'indice de corrélation entre chaque lame est toujours supérieur à 0.95 et très souvent supérieur à 0.98. Ces résultats montrent une forte corrélation dans les données.

Cependant, après avoir soumis les données de ces puces à un algorithme de classification hiérarchique' (figure 3.4) nous avons observé que les échantillons avaient tendance à se regrouper en fonction de leur portée d'origine et/ou de la lame sur laquelle ils ont été hybridés. Nous avons donc procédé à une normalisation des 18 puces en transformant les signaux de fluorescence de façon à obtenir une moyenne des signaux identiques sur chaque lame. C'est la normalisation la plus simple. Nous avons également testé des normalisations plus élaborées tels qu'un LOWESS généralisé à n puces ainsi qu'une normalisation par les quantiles. Cependant ces différentes méthodes de normalisation n'ont apporté aucun changement dans les résultats. Aussi, nous avons décidé de garder la normalisation par la moyenne.

Après normalisation nous avons à nouveau tenté de grouper les échantillons par classification hiérarchique. Si l'on considère l'expression des seuls gènes en 3 copies, les échantillons Ts1Cje et contrôles sont parfaitement clusterisés. Ce dernier résultat n'est pas étonnant puisque tous les gènes en 3 copies exprimés sont significativement surexprimés dans la couche granulaire externe du cervelet chez les souris Ts1Cje (figure 3.7 page 106). Par contre, comme pour le cervelet entier, il est impossible de séparer les échantillons Ts1Cje et contrôles en considérant l'expression de l'ensemble des gènes en 2 copies. De plus, après normalisation, les échantillon ont toujours tendance à se regrouper par portée suggérant des différences réelles entre les portées.

Nous avons dans un premier temps pratiqué une ANOVA à 2 facteurs sur ces données afin de distinguer les gènes spécifiquement régulés dans la couche externe du cervelet des souris Ts1Cje et les gènes différenciellement exprimés entre les échantillons des 3 portées. Malheureusement, notre plan d'expériences ne nous a pas permis de mener cette analyse. En effet, en hybridant sur chaque lame les animaux d'une même portée il a été impossible de distinguer les effets de portée des effets de lame. Autrement dit nous ne pouvions pas savoir si les différences d'expression observées étaient dues à l'origine de l'échantillon ou à la lame sur lequel il avait été hybridé.

Afin de distinguer les gènes différenciellement exprimés chez les souris Ts1Cje des

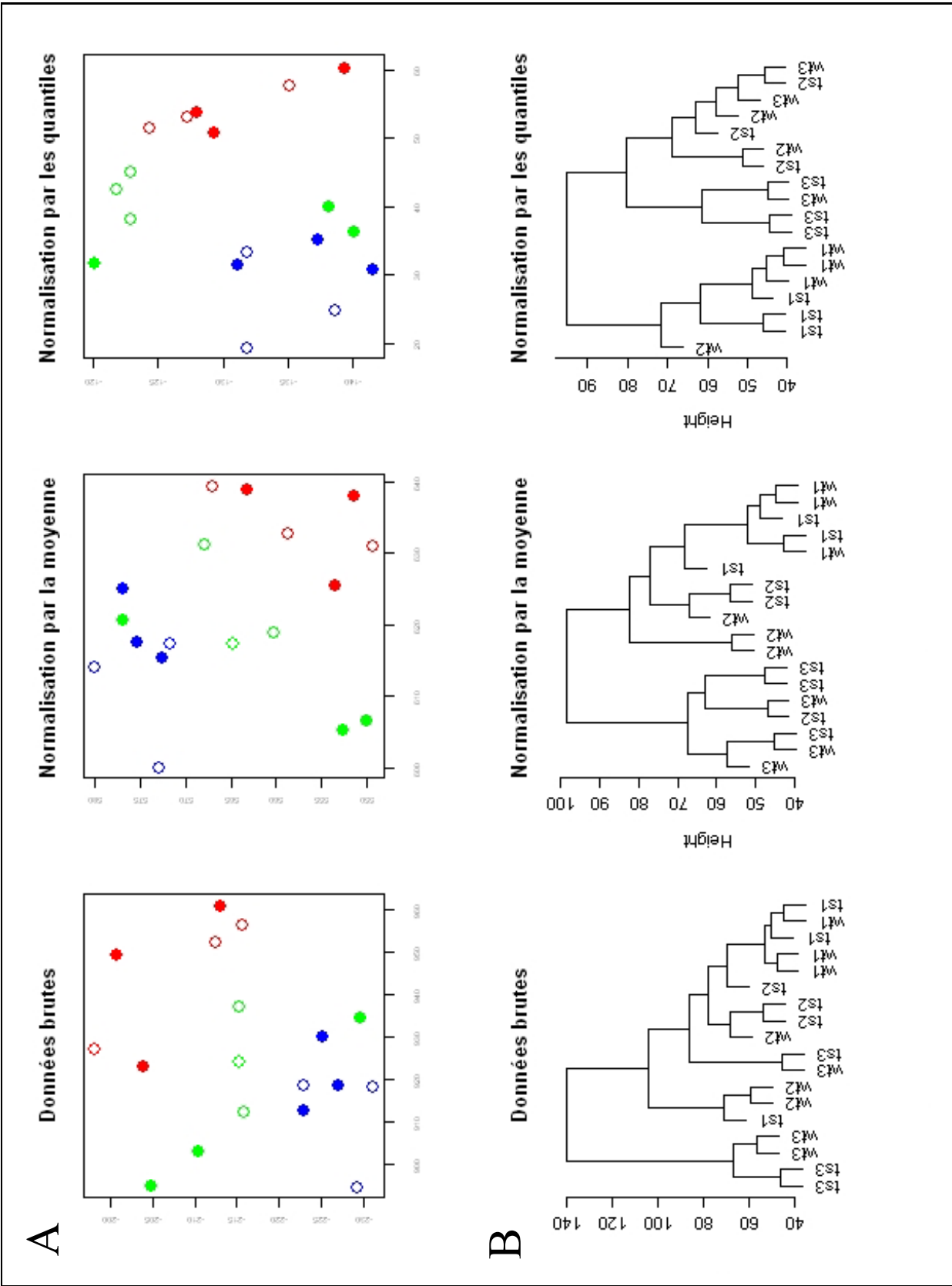


FIGURE 3.4: Analyse en composantes principales (A) et classification hiérarchique (B) des échantillons en fonction des données brutes et normalisées des puces Illumina. Les symboles pleins représentent les souris TsICje et les symboles vides les souris contrôles. Tous les échantillons ont issus de 3 portée représentées en bleu, rouge et vert.

3 portées, nous avons comparé l'expression de chaque gène entre les souris Ts1Cje et contrôles à l'aide du test de Student (*t* test) avec une marge d'erreur de type I de 5%. Nous avons obtenu 11 305 gènes exprimés chez les souris Ts1Cje et contrôles. Parmi eux 479, soit environ 4%, sont différentiellement exprimés chez les souris Ts1Cje avec des rapports d'expression allant de 0,44 à 2,06 ($p < 0.05$). Ce pourcentage est comparable à celui observé dans le cervelet entier entre P0 et P10.

L'histogramme des rapports d'expression de l'ensemble des gènes exprimés centré approximativement sur 1 (1.02 ± 0.08 , figure 3.5-A) illustre bien ce faible pourcentage de gènes dérégulés. Par contre, lorsqu'on se limite aux gènes en 3 copies, l'histogramme des rapports d'expression est clairement déplacé vers des valeurs supérieures (1.38 ± 0.11) mettant en évidence l' 'effet primaire' de dosage génique.

L'importance de cet effet primaire est également observé lorsqu'on regroupe les gènes selon leur localisation chromosomique. Comme le montre la figure 3.6, seule la partie tripliquée du chromosome 16 voit l'expression moyenne de ses gènes significativement différente chez les souris Ts1Cje par rapport aux souris contrôles (rapport=1,38, $p < 0.001$, *t*-test). Par contre la variance de l'expression des gènes en 3 copies n'est pas plus élevée que celles des gènes en 2 copies sur chaque chromosome.

La distribution des *p*-valeurs des rapports d'expression est également très différente entre les gènes en 2 et en 3 copies (figure 3.5-B). La distribution des *p*-valeurs associées aux rapports d'expression des gènes en 2 copies suit une loi uniforme, homogène entre 0 et 1, indiquant que très peu de gènes sont significativement différentiellement exprimés. Par contre, pour les gènes en 3 copies, toutes les valeurs sont inférieures à 0,05 (inférieur à 0,01 pour la majorité d'entre eux). Cela signifie que tous les gènes en 3 copies exprimés dans la couche granulaire externe du cervelet à P0 sont différentiellement exprimés (en fait surexprimés) chez les souris Ts1Cje.

Afin de réduire le nombre de faux positifs dans nos résultats, nous avons appliqué la procédure de contrôle du taux de faux positifs de Benjamini et Hochberg sur les *p*-

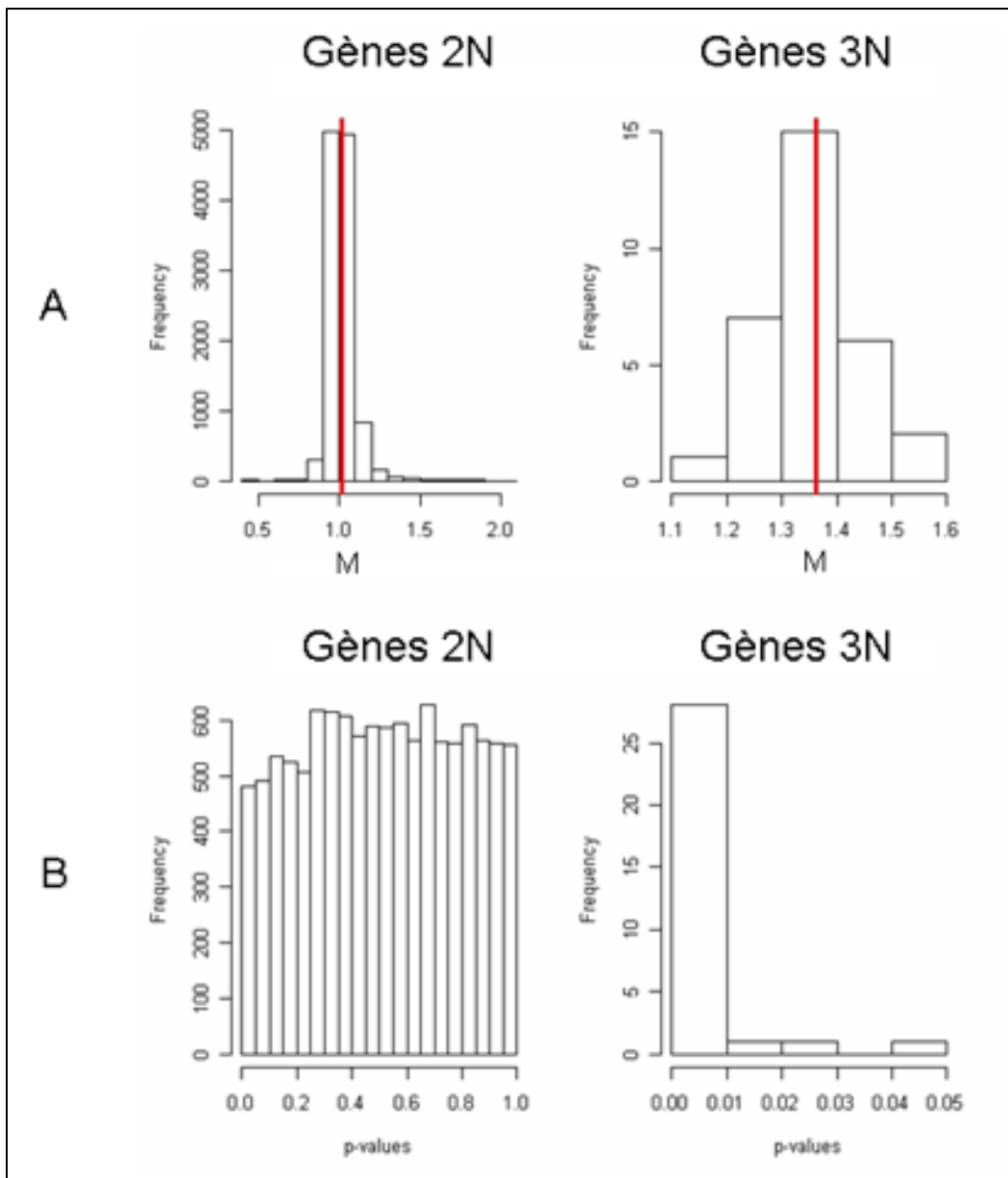


FIGURE 3.5: Distribution des rapports d'expression des 11305 gènes en 2 copies (2N) et des 35 gènes en 3 copies (3N) (A) et de leurs p-valeurs (B) dans la couche granulaire externe du cervelet à P0.

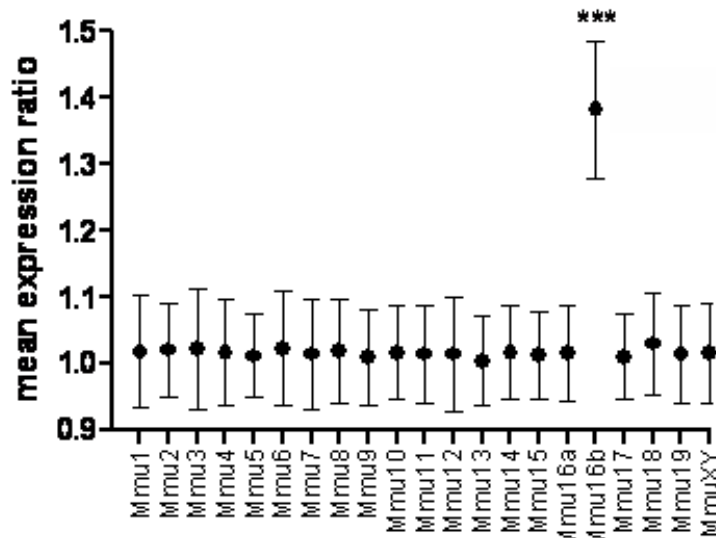


FIGURE 3.6: Moyenne des rapports d'expression des gènes selon leur localisation chromosomique. Les gènes en 2 et 3 copies du chromosome Mmu16 ont été séparés (Mmu16a et Mmu16b respectivement).

valeurs du *t*-test (FDR pour False Discovery Rate, Benjamini and Hochberg, 1995). Après application du FDR, nous avons obtenu une liste réduite de 32 gènes significativement différentiellement exprimés ($q < 0.05$). Comme on peut le voir dans la table 3.1, 27 de ces gènes sont surexprimés chez les souris Ts1Cje par rapport aux contrôles et 5 sont réprimés. De plus parmi ces 32 gènes, 23 sont des gènes en 3 copies (en gras dans la table). Autrement dit, près de 70% des gènes les plus significativement surexprimés sont des gènes en 3 copies, ce qui souligne encore ici l'effet majeur de dosage génique dans la modification du transcriptome chez les souris Ts1Cje. Enfin, la table 3.2 regroupe les gènes en 3 copies qui n'ont pas été validés par la processus de Benjamini et Hochberg. On remarque qu'ils ont tous été significatifs lors du test de Student ($p < 0.05$).

Les 9 autres gènes en 2 copies sont localisés sur 8 autres chromosomes et sont impliqués dans le transport des ions, la transduction du signal, la prolifération cellulaire et des processus liés à l'ADN.

Nous avons procédé à une analyse fonctionnelle des gènes différentiellement exprimés (*t*-test) afin de dégager des groupes de gènes impliqués dans des voies communes. L'analyse n'a révélé aucun enrichissement de voies de signalisation impliquées dans la

prolifération. Au contraire nous avons observé une déplétion dans des catégories impliquées dans la signalisation cellulaire et un enrichissement dans des catégories impliquées dans la régulation de la transcription, la neurogénèse et l'homéostasie de cations. La liste des principales catégories fonctionnelles enrichies ou déplétées est disponible en annexe page 153.

SYMBOLE	rapport	p-valeur	q-valeur	Chr	Ontologie (processus biologique)
<i>1810007M14Rik</i>	1,53	0,000	0,004	16	Régulation de la transcription
<i>2400009B08Rik</i>	0,8	0	0,029	8	
<i>2610039C10Rik</i>	1,5	0,000	0,038	16	
<i>Atp5o</i>	1,27	0,000	0,001	16	processus de biosynthèse de'ATP, transport de l'H⁺
<i>B3galt5</i>	1,4	0,000	0,014	16	glycosylation des protéines
<i>Brwd1</i>	1,35	0,000	0,036	16	Régulation de la transcription
<i>Cbr1</i>	1,32	0,000	0,007	16	Activité carbonyle réductase (NADPH)
<i>Cdca7l</i>	0,46	0	0	12	Prolifération cellulaire, transcription
<i>Chaf1b</i>	1,43	0,000	0,036	16	Cycle cellulaire, réplication de l'ADN, transcription
<i>Dscam</i>	1,47	0,000	0,029	16	Adhésion cellulaire, développement du système nerveux
<i>Dyrk1a</i>	1,35	0,000	0,003	16	Phosphorylation peptidyle-tyrosine
<i>Entpd3</i>	0,84	0	0,028	9	processus du catabolisme des nucléosides diphosphates
<i>Ets2</i>	1,49	0,000	0,021	16	Régulation du cycle cellulaire
<i>Gin1</i>	1,19	0	0,007	1	Recombinaison de l'ADN
<i>Gng4</i>	0,63	0	0,002	13	Transduction du signal
<i>Hfml</i>	1,29	0	0,016	5	
<i>Hlcs</i>	1,33	0,000	0,003	16	Modification des Protéines
<i>Ifngr2</i>	1,35	0,000	0,001	16	
<i>Itsn1</i>	1,26	0,000	0,003	16	Régulation de la transduction du signal de Rho, endocytose
<i>Kcns2</i>	1,19	0	0,044	15	
<i>Mrps6</i>	1,43	0,000	0,001	16	Traduction
<i>OTTMUSG00000018617</i>	1,65	0	0,001	19	
<i>Pigp</i>	1,33	0,000	0,022	16	Ancrage par GPI
<i>Psmg1</i>	1,43	0,000	0,003	16	Prolifération cellulaire
<i>Rcan1</i>	1,37	0,000	0,003	16	Signalisation du Ca²⁺
<i>Setd4</i>	1,25	0,000	0,011	16	
<i>Sfrs15</i>	1,39	0,000	0,029	16	
<i>Sod1</i>	1,59	0,000	0,001	16	Régulation négative de l'apoptose des neurones, réponse stress oxydatif
<i>Sp4</i>	0,62	0	0,001	12	
<i>Tmem50b</i>	1,42	0,000	0,001	16	
<i>Ttc3</i>	1,29	0,000	0,036	16	Liaison au Zn²⁺
<i>Wrb</i>	1,4	0,000	0,001	16	

TABLE 3.1: Liste des gènes différentiellement exprimés après le FDR dans la couche granulaire externe du cervelet chez les souris Ts1Cje à P0 ($q < 0.05$). Les gènes en gras sont présents en 3 copies chez la souris Ts1Cje. Chr : chromosome

SYMBOLE	rapport	<i>p</i> -valeur	<i>q</i> -valeur	Chr	Ontologie (processus biologique)
<i>Girk2</i>	1,58	0,000	0,109	16	Transport du K ⁺
<i>Son</i>	1,48	0,001	0,206	16	
<i>CryzII</i>	1,4	0,000	0,084	16	Liaison au Zn ²⁺
<i>Gart</i>	1,37	0,000	0,080	16	biosynthèse des nucléotides purines
<i>Olig1</i>	1,37	0,048	0,996	16	Destin neuronale
<i>Donson</i>	1,34	0,000	0,109	16	Développement des organisme multi-cellulaires
<i>Dscr3</i>	1,33	0,001	0,238	16	Transport vacuolaire
<i>Olig2</i>	1,3	0,002	0,343	16	Destin neuronale
<i>Hmgn1</i>	1,28	0,000	0,109	16	Établissement et/ou maintient de la structure de la chromatine
<i>Cbr3</i>	1,25	0,030	0,996	16	Processus métaboliques
<i>Prdm15</i>	1,23	0,002	0,331	16	
<i>Ifnar2</i>	1,16	0,019	0,996	16	Prolifération cellulaire

TABLE 3.2: Liste des gènes en 3 copies non significativement régulés après le FDR dans la couche granulaire externe du cervelet chez les souris Ts1Cje à P0 ($p < 0.05$). Chr : chromosome

Nous avons également procédé à une analyse en composantes principales (ACP) des données d'expression des 18 souris (9 souris Ts1Cje et 9 souris contrôles provenant de 3 portées). Comme le montre la figure 3.7, lorsque l'on prend en compte l'expression des 11 305 gènes, il est impossible de distinguer les souris Ts1Cje (en blanc) des souris contrôle (en noir) (figure 3.7-A). Au contraire, en ne considérant que l'expression des 35 gènes en 3 copies chez les souris Ts1Cje, 2 groupes d'individus se forment clairement, séparant les souris Ts1Cje des souris contrôles (figure 3.7-B).

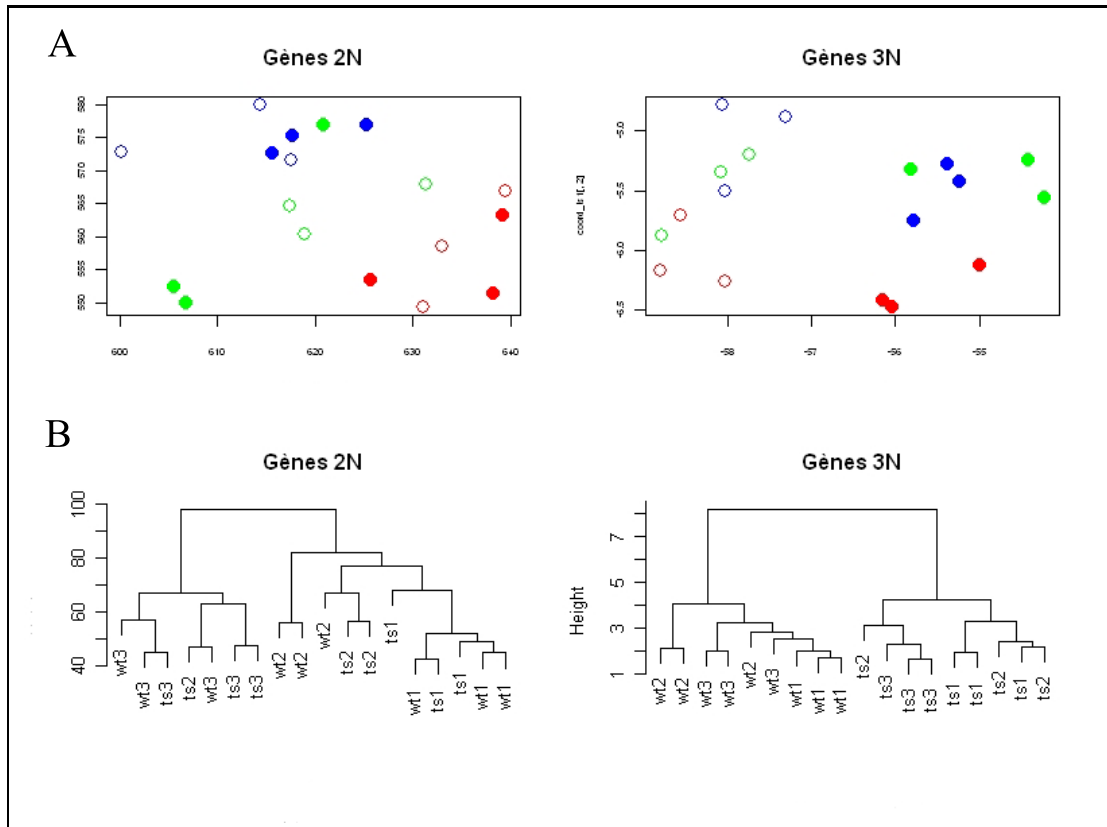


FIGURE 3.7: Analyse en composantes principales (A) et classification hiérarchique (B) des échantillons en fonction de l'expression des gènes en 2 copies (2N) et 3 copies (3N) dans la couche externe du cervelet à P0. Les symboles pleins représentent les souris Ts1Cje et les symboles vides les souris contrôles. Tous les échantillons ont issus de 3 portée représentées en bleu, rouge et vert.

Comme pour le cervelet, l'ensemble des analyses du transcriptome dans la couche granulaire externe tend à montrer un effet majeur du dosage génique dans le transcriptome de la couche externe du cervelet des souris Ts1Cje à P0.

Chapitre 4

Identification d'une monosomie partielle du chromosome 12 dans la souris Ts1Cje.

Parmi les 5 gènes dont l'expression est significativement diminuée dans les cellules de la couche externe du cervelet des souris Ts1Cje à P0, 2 sont localisés dans la région télomérique du chromosome 12 : *Cdca7l* et *Sp4* (table 3.1 page 104). Leurs rapports d'expression entre souris Ts1Cje et contrôles sont de 0.62 et 0.46 respectivement. Puisque la lignée de souris Ts1Cje est le résultat d'une translocation de la partie distale du chromosome 16, depuis le gène *Sod1* jusqu'au gène *Znf295*, sur la région télomérique du chromosome 12 et que l'expression de ces 2 gènes de la région télomérique du chromosome 12 est diminuée d'environ 50%, nous avons suspecté une possible délétion de cette région lors du remaniement chromosomique.

Pour confirmer l'hypothèse d'un réarrangement chromosomique, nous avons procédé à des hybridations d'ADN génomique sur des puces Agilent CGH (comparative genomic hybridization) en utilisant des puces de haute résolution (une sonde tous les 6,4 kb en moyenne) et couvrant la totalité du génome murin. Nous avons pour cela hybridé l'ADN génomique de 2 souris Ts1Cje femelles contre l'ADN génomique de 2 souris mâles contrôles sur 2 puces (duplicat). Le choix d'hybrider de l'ADN de souris femelles avec de l'ADN de souris mâles nous permet de nous servir des chromosomes X et Y comme contrôles positifs.

L'analyse de ces puces a permis d'observer plusieurs régions dupliquées ou délétées que l'on peut regrouper en 3 classes :

1. Une délétion d'une copie totale du chromosome Y ainsi qu'une duplication du chromosome X entier ont été détectées chez les souris Ts1Cje ce qui correspond à notre contrôle positif.
2. Des micro-délétions ainsi que des micro-duplications ont été observées sur une puce mais pas l'autre, plus rarement sur les 2 puces. Il s'agit souvent de régions connues pour comprendre des éléments appelés CNV (copy number variants) qui sont des régions connaissant des changements fréquents dans leur nombre de copies selon les individus. Cela explique que ces régions ne soient pas retrouvées dans les 2 expériences.
3. Enfin, nous avons identifié 2 événements majeurs :
 - Une réduction de 50% du matériel chromosomique sur la partie télomérique du chromosome 12 (figure 4.1) entre les positions 119 291 726 et 121 252 484 (base de donnée Ensembl version 48 - Dec 2007 - www.ensembl.org). Le segment délété s'étend sur 2 Mb et contient 5 gènes : *Dnahc11*, *Sp4*, *Sp8*, *Abcb5* et *Itgb8*. Ces 5 gènes sont impliqués dans la prolifération ou la maturation neuronale, l'embryogénèse ou le développement du système nerveux central et périphérique.
 - Nous avons également retrouvé la duplication de la partie distale du chromosome 16 (figure 4.2). Elle commence à la position 90 168 800, tout juste proximale au gène *Sod1* (90 220 987) et s'étend jusqu'à la position 98 303 726 ce qui correspond à la fin de la partie télomérique du chromosome 16. L'intervalle de la partie dupliquée représente environ 8 Mb.

Ces remaniements chromosomiques sont résumés sur la figure 4.3. Les fonctions des gènes localisés sur ce fragment ainsi que leurs possibles implications dans le phénotype de la souris Ts1Cje sont discutés au chapitre 1 de la discussion page 114.

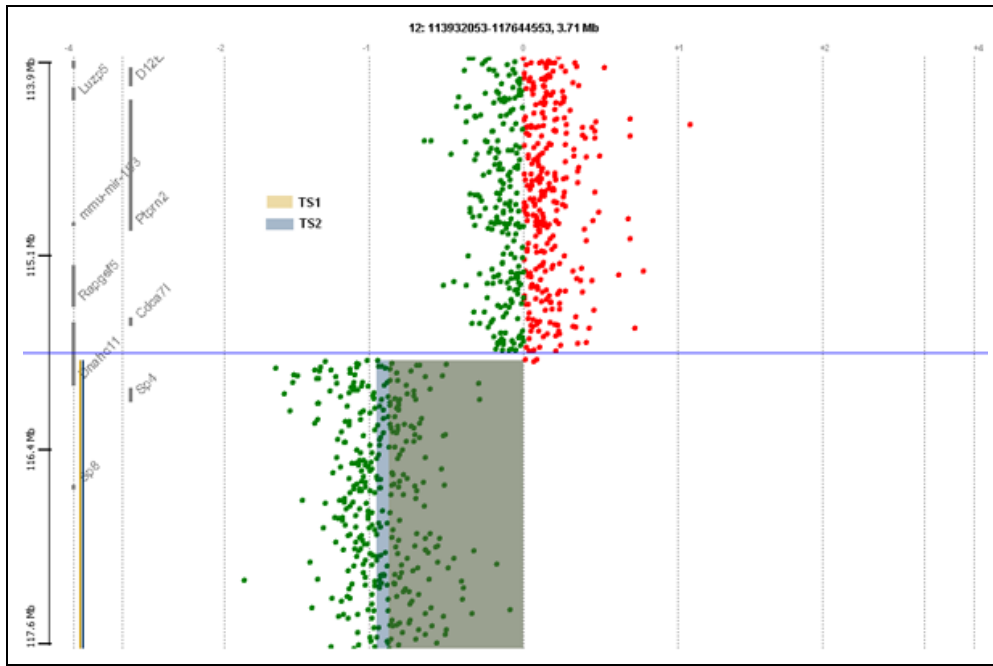


FIGURE 4.1: Visualisation des rapports de fluorescence des sondes dans la région 12qF2. En vert sont représentées les sondes sous-exprimées chez les souris Ts1Cje, en rouge les sondes surexprimées.

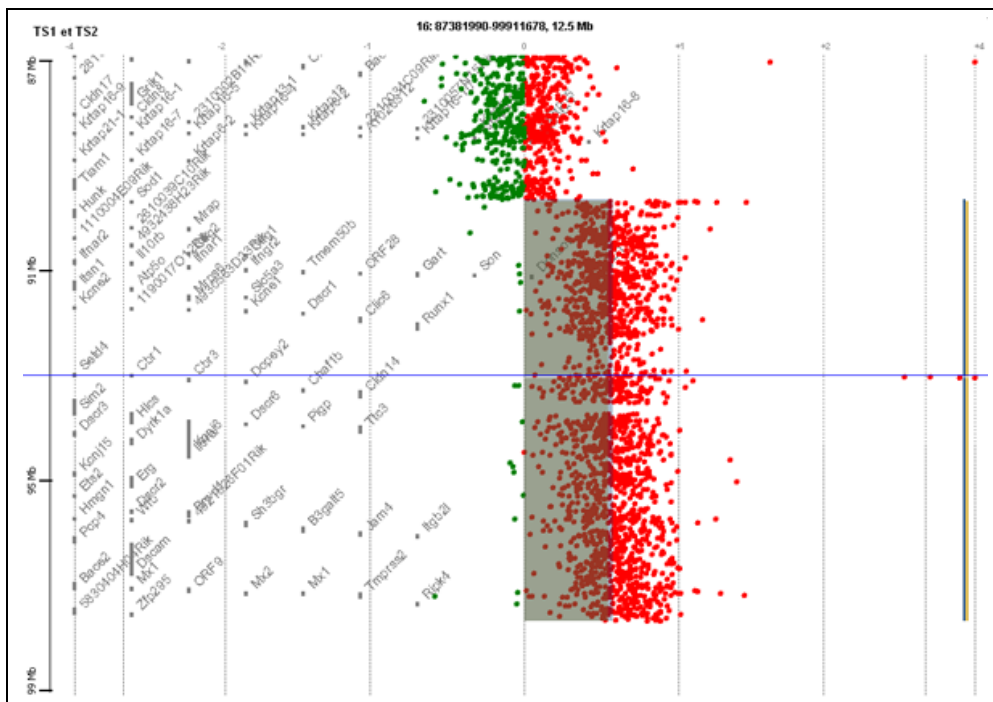


FIGURE 4.2: Visualisation des rapports de fluorescence des sondes dans la région 16qC3.3. En vert sont représentées les sondes sous-exprimées chez les souris Ts1Cje, en rouge les sondes surexprimées.

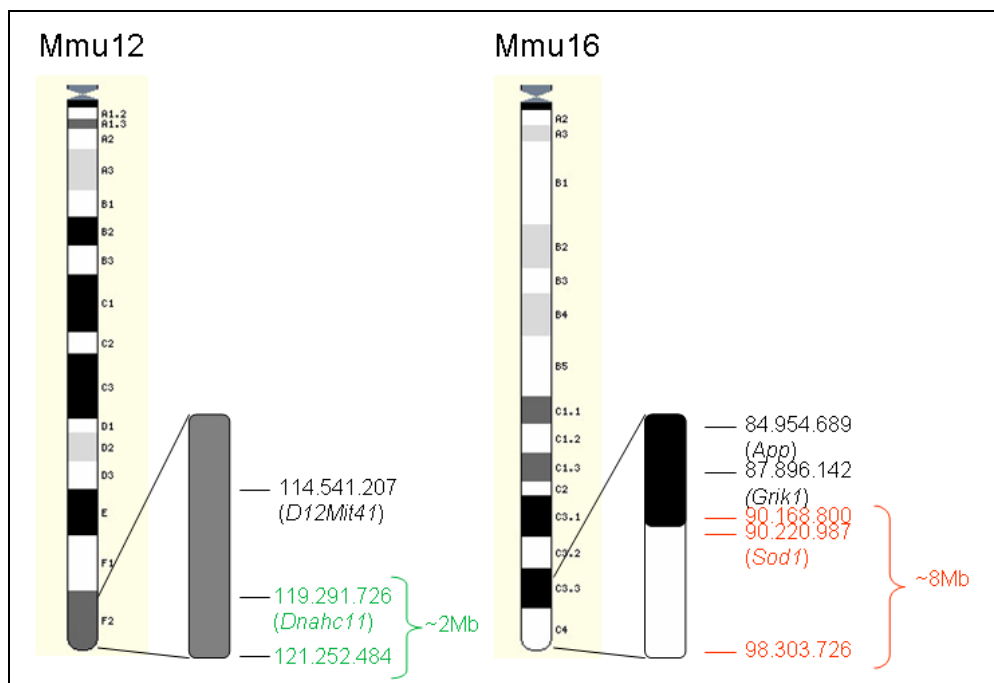


FIGURE 4.3: Schémas récapitulatif des remaniements chromosomiques chez la souris Ts1CJe. En vert est représentée la région délétée sur le chromosome 12 chez les souris Ts1CJe, en rouge la partie dupliquée.

Discussion

Préambule

Les individus atteints de Trisomie 21 présentent un phénotype variable causé par la présence d'une copie supplémentaire du chromosome 21. Il s'agit du plus petit chromosome du génome humain contenant approximativement 350 gènes codant pour des protéines. La mise au point de modèles murins de la Trisomie 21 permet d'étudier l'expression des gènes en 3 copies dans de multiples tissus au cours du développement. Cependant, malgré les différentes études menées à ce jour dans divers modèles murins et différentes lignées cellulaires humaines, la relation entre le génotype et le phénotype des individus porteurs de Trisomie 21 n'est toujours pas clairement comprise.

C'est pourquoi nous avons voulu analyser l'expression des gènes, et notamment des gènes en 3 copies, dans le cervelet des souris Ts1Cje. En effet, la diminution du volume du cervelet est un phénotype constant de la Trisomie 21 et la lignée Ts1Cje qui reproduit ce phénotype, n'est trisomique que pour une partie des gènes orthologues au chromosome 21, réduisant ainsi le nombre de gènes candidats.

Cette étude nous a permis de confirmer l'hypoplasie cérébelleuse observée dans la lignée Ts1Cje. Nous avons également montré une diminution de l'index de prolifération des cellules granulaires au début du développement du cervelet. Les cellules granulaires étant la population majoritaire du cervelet, il est probable que cette diminution de la prolifération soit la cause de l'hypoplasie observée chez l'adulte.

Enfin, l'analyse du transcriptome du cervelet au cours du développement postnatal et plus particulièrement dans la couche granulaire externe, a mis à jour un effet primaire majeur du dosage génique, aussi bien pour les gènes en 3 copies que pour les gènes

présents en 1 seule copie qui ont été délétés lors du réarrangement chromosomique à l'origine du modèle et que nous avons pour la première fois identifiés.

S'appuyant sur les résultats présentés dans ce manuscrit et les données de la littérature, cette discussion abordera 4 points principaux :

1. La validation de notre modèle d'étude, en particulier eu égard la délétion mise en évidence chez la souris Ts1Cje.
2. Les altérations de la prolifération dans le cadre de la Trisomie 21.
3. Les statistiques appliquées à l'analyse de l'expression des gènes.
4. Ainsi que les stratégies permettant de trouver des gènes candidats.

Chapitre 1

Validation de notre modèle d'étude

1.1 L'influence du fond génétique.

Les individus porteurs de Trisomie 21 présentent de manière constante une diminution du volume du cervelet (Aylward et al., 1997; Raz et al., 1995). Ce phénotype est également présent dans 2 modèles de trisomie segmentaire : les souris Ts1Cje et les souris Ts65Dn (Olson et al., 2004; Baxter et al., 2000). Cette diminution du volume du cervelet a été estimée à environ 12% dans ces 2 modèles. D'après les images obtenues par IRM à partir de cerveaux fixés et disséqués. Cette technique présente l'avantage de laisser les cerveaux plusieurs heures dans l'appareil d'IRM afin d'obtenir des images avec une très grande résolution : 125 μ m isotropes pour les Ts65Dn (Baxter et al., 2000) et 62,5 x 62,5 x 125 μ m pour les souris Ts1Cje (Olson et al., 2004).

Possédant une colonie de souris Ts1Cje élevée sur un fond génétique différent des souris Ts1Cje utilisées par Olson et al. (2004), nous avons également utilisé l'IRM afin de déterminer si la diminution du volume du cervelet était également présente dans notre colonie. Nous avons préféré mesurer le volume du cerveau *in vivo* afin d'être au plus près des conditions physiologiques de la souris et d'éviter ainsi les biais qui peuvent intervenir lors des étapes de perfusion et de fixation.

Nous avons donc du mettre au point une séquence courte (moins de 2h) car les souris anesthésiées ne peuvent pas rester plus longtemps à l'intérieur de l'appareil d'IRM à cause

de la température inférieure à 20°C. De plus nous avons dû optimiser les paramètres de la séquence afin d'obtenir les images les plus précises possibles. Nous sommes finalement arrivés à mettre au point une séquence d'1h58 permettant d'obtenir des images avec une résolution isotrope de 102 μ m.

Nous observons une diminution du volume du cervelet d'environ 15% chez les souris Ts1Cje, ce qui est cohérent avec les précédentes études. L'hypoplasie cérébelleuse ne dépend donc pas du fond génétique.

1.2 L'hypoplasie cérébelleuse est-elle un phénotype spécifique à la Trisomie 21 ?

Il est communément admis que les patients porteurs d'une Trisomie 21 présentent une réduction significative du volume du cerveau et en particulier du cervelet (Crome et al., 1966; Ieshima et al., 1984; Wisniewski, 1990; Weis et al., 1991; Raz et al., 1995; Aylward et al., 1997; Pinter et al., 2001; Kaufmann et al., 2003; White et al., 2003). Cependant, certains auteurs ont émis l'hypothèse que cette hypoplasie ne serait pas propre à la Trisomie 21 et que son étude ne serait d'aucune utilité pour la compréhension des relations génotype-phénotype chez les individus porteurs de Trisomie 21 (principalement Shapiro, 2001).

En effet, l'hypoplasie du cervelet n'est pas propre à la Trisomie 21. La requête 'cerebellar hypoplasia' dans la base de donnée OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man - www.ncbi.nlm.nih.gov/) affiche 182 entrées à ce jour. Une réduction du volume du cervelet peut être observée dans plusieurs syndromes et différentes aneuploïdies autres que la Trisomie 21 telles que les Trisomies 13 et 18. En cela, ce phénotype ne diffère pas des autres puisque l'ensemble des phénotypes observés chez les patients porteurs de Trisomie 21 est présent dans la population général, bien qu'à des occurrences inférieures.

Pour certains auteurs, le fait que ce phénotype soit commun aux Trisomies 13, 18 et 21 suggère que la réduction du volume du cervelet n'est pas due à la présence en 3 copies

de certains gènes mais plutôt à l'état trisomique en lui même, à la présence de matériel chromosomique supplémentaire quel que soit les gènes concernés. Cette hypothèse rejoint le modèle de la 'rupture de l'homéostasie' selon lequel le phénotype associé à la Trisomie 21 serait dû à la dérégulation non spécifique de dizaines/centaines de gènes. L'article de Shapiro (2001) défend cette hypothèse.

Cette hypothèse peut être critiquée sur plusieurs points :

1. Les gènes qui gouvernent le développement du cervelet ne sont pas tous localisés sur le chromosome 21. Il est raisonnable de penser que ces gènes sont localisés sur l'ensemble des chromosomes. A ces gènes il faut ajouter ceux qui n'ont pas de rôle propre dans le développement du cervelet mais peuvent l'influencer lorsqu'ils sont sur-exprimés par exemple. Chaque processus se déroulant lors du développement du cervelet met en jeu plusieurs gènes qui interagissent entre eux. Aussi, tous ces processus peuvent être inhibé par la dérégulation de chacun de ces gènes. Il n'est donc pas surprenant que plusieurs aneuploïdies puissent aboutir à un même phénotype.
2. De plus, un même phénotype peut avoir plusieurs origines. L'hypoplasie du cervelet peut survenir à cause d'une réduction de la prolifération des progéniteurs au cours du développement dans une pathologie et d'un phénomène d'apoptose exacerbé dans une autre. Ainsi, des causes diverses peuvent aboutir à un phénotype en apparence identique.
3. Comme nous l'avons dit en introduction de ce manuscrit, l'élaboration de modèles animaux surexprimant un ou quelques gènes du chromosome 21 humain et manifestant des phénotypes présents dans la Trisomie 21 suggère une origine gène-spécifique des différents phénotypes associés à la Trisomie 21. Bien qu'aucune réduction du volume du cervelet n'ait été rapportée dans ces modèles, cela ne veut pas dire qu'elle n'est pas présente car bien souvent le volume du cervelet de ces souris n'a pas été mesuré.
4. Une réduction sensible du cervelet a été observée dans les 2 principaux modèles mu-

rins de trisomie segmentaire du chromosome 16 : les souris Ts65Dn et Ts1Cje. Cependant, aucune hypoplasie n'a été mise en évidence dans le modèle Ms1/Ts65Dn qui est trisomique pour environ $\frac{1}{3}$ des gènes en 3 copies dans la souris Ts65Dn. De plus seule une faible diminution du volume du cervelet a été mesurée dans le modèle Ts1Rhr, trisomique pour la région appelée DSCR et présente dans les souris Ts65Dn et Ts1Cje. Au contraire, le modèle Ms1Rhr, monosomique pour la région DSCR présente une légère augmentation du volume du cervelet. Cet antiparallélisme entre ces 2 modèles monosomique et trisomique pour une même région chromosomique suggère donc une origine génique du phénotype.

5. Enfin, l'étude du transcriptome que nous avons menée, en particulier dans la couche externe à la naissance, n'a pas montré la dérégulation d'un grand nombre de gènes mais plutôt d'un nombre restreint principalement constitué de gènes en 3 copies. Ces résultats soutiennent donc l'hypothèse du 'dosage génique' face à l'hypothèse de la 'rupture de l'homéostasie'.

Ainsi nous pensons que la diminution du volume du cervelet observée chez les patients porteurs de Trisomie 21 et plusieurs modèles murins est bien un phénotype causé par un ou plusieurs gènes présents en 3 copies.

1.3 La délétion de la partie télomérique d'une copie du chromosome 12 invalide t-elle le modèle Ts1Cje ?

A la vue des résultats de notre analyse du génome avec des puces CGH, une nouvelle critique peut être soulevée : le phénotype observé, en particulier au niveau du cervelet, est-t-il dû à la présence des gènes en 3 copies (i.e. à la trisomie) ou bien peut-il être causé par la sous-expression des gènes délétés ?

De fait, nous avons détecté un effet de dosage génique pour les gènes présents en une seule copie dans la souris Ts1Cje. Ces gènes sont localisés sur un segment de 2Mb de la partie télomérique du chromosome 12. Cette délétion a certainement eu lieu lors de la

translocation de la partie distale du chromosome 12 sur le télomère du chromosome 16.

Dans son article original, Sago et al. (1998) avaient observé l'hybridation du BAC T12 sur les 2 copies du chromosome 12 dans la souris Ts1Cje. Le BAC T12 est un chromosome artificiel bactérien couvrant la région D12Mit41 située sur la partie distale du chromosome 12. Les auteurs avaient donc conclu que le chromosome 12 était intact. En fait, le BAC T12 correspond à une séquence située à environ 7Mb du télomère. C'est pourquoi les auteurs n'ont pas pu détecter la délétion des 2 derniers Mb du chromosome 12. La figure 4.3 page 110 représente les modifications du génome dans la souris Ts1Cje. En noir y sont reportés les sondes utilisées par Sago et al. (1998).

La technologie des puces CGH nous a permis d'analyser finement cette délétion. Le segment délété comprend 5 gènes : *Dnahc11*, *Sp4*, *Sp8*, *Abcb5* and *Itgb8*.

- Le premier d'entre eux, *Dnahc11* pour 'dynein axonemal heavy chain 11' est nécessaire pour la latéralité du développement. Il est exprimé au cours du développement embryonnaire du cerveau et du tube neural à partir de E10,5 chez la souris et est localisé dans les cellules ciliées telles que les cellules de l'épendyme du 3ème ventricule du cerveau. La délétion totale du gène provoque une randomisation de la latéralité (Supp et al., 1999). *Dnahc11* est également impliqué dans la ségrégation sélective des chromatides dans des lignées murines (Armakolas and Klar, 2007).
- *Sp4* et *Sp8* sont 2 membres de la famille des facteurs de transcription en doigt de zinc. *Sp4* est fortement exprimé au cours du développement de l'hippocampe et du cervelet, en particulier dans les cellules granulaires du cervelet (Ramos et al., 2007). On observe dans les souris dépourvues du gène *Sp4* un accroissement du nombre de dendrites fortement ramifiées durant la maturation des cellules granulaires dans le cortex cérébelleux (Ramos et al., 2007). Une diminution de la prolifération dans l'hippocampe mais pas dans le cervelet de ces souris a aussi été observée (Zhou et al., 2007). *Sp8* est aussi exprimé dans le système nerveux au niveau de l'encéphale et de la moelle épinière. Les souris déficientes pour ce gène présentent de multiples défauts tel qu'un déplacement postérieur de l'organisateur isthmique.

Sp8 pourrait jouer un rôle dans la prolifération en interagissant avec *Wnt1* et *Fgf8*. Cependant, nous n'avons pas détecté l'expression de ces gènes dans la couche granulaire externe du cervelet. En absence de *Sp8*, la plupart des embryons ne développent pas de structure cérébelleuse (Griesel et al., 2006).

- *Abcb5* est un transporteur de type ABC ('ATP-Binding Cassette') impliqué dans la chimiorésistance (Huang et al., 2004). Il est exprimé dans les cellules pigmentaires et pourrait jouer un rôle dans la mélanogénèse (Chen et al., 2005). En fait, les cellules de mélanome exprimant *Abcb5* possèdent une capacité tumorigène accrue et présentent des capacités particulières d'auto-renouvellement et de différenciation (Schatton et al., 2008).
- Enfin, *Itgb8* est un membre de la famille des intégrines à chaîne bêta. Son expression se limite principalement au rein, cerveau et placenta (Lakhe-Reddy et al., 2006). Il pourrait également servir de récepteur à la fibrine dans les cellules de Schwann et ainsi jouer un rôle dans la réparation des nerfs (Chernousov and Carey, 2003). La perte d'*Itgb8* au niveau des cellules dendritiques provoque un phénomène d'auto-immunité chez la Souris (Travis et al., 2007).

Il faut noter que ces travaux ont été réalisés sur des souris ou des cultures cellulaires dans lesquels l'expression de ces gènes était soit totalement supprimée, soit amplifiée. Aucune donnée n'est disponible quant aux conséquences d'une sous-expression de 50% de ces 5 gènes sur le développement, en particulier le développement du système nerveux.

De plus, parmi ces 5 gènes, *Sp4* est le seul gène dont nous avons pu détecter l'expression dans la couche granulaire externe du cervelet des souris Ts1Cje. Or *Sp4* ne semble pas impliqué dans des processus liés à la prolifération mais plutôt à la maturation des neurones. S'il devait avoir un effet sur le développement il serait donc postérieur à P0 dans le cervelet.

Enfin, les conséquences graves telle que l'absence de cervelet dans les souris KO pour le gène *Sp8* n'étant pas présentes dans les souris Ts1Cje, on peut raisonnablement penser que la délétion d'une copie de ce gène n'a pas les mêmes conséquences sur le

développement de la souris Ts1Cje. Aucun défaut majeur du développement du système nerveux ayant été rapporté dans cette lignée, on peut penser à fortiori que la délétion d'une copie de ces 5 gènes n'est pas responsable du phénotype observé.

Nous avons observé une diminution de l'expression de *Cdca7l*, un facteur de transcription impliqué dans l'apoptose (Ou et al., 2006) et la transformation des médulloblastomes (Huang et al., 2005) situé en aval du point de translocation sur le chromosome 12, donc en 2 copies dans la souris Ts1Cje. Il est donc possible que d'autres gènes situés près du point de translocation soient dérégulés dans d'autres organes et à différents temps chez la souris Ts1Cje. Cela pourrait s'expliquer par la présence de séquences régulatrices sur le segment délété par exemple.

Enfin, les souris Ts65Dn, un autre modèle murin de Trisomie 21, présentent également une hypoplasie du cervelet dans des proportions proches. Or dans ce modèle, le chromosome 12 est intact. L'hypoplasie du cervelet est donc un phénotype constitutif de la Trisomie 21, toujours présent chez les patients et observé dans plusieurs modèles murins. Il constitue donc un modèle de choix pour étudier les relations entre le génotype et le phénotype dans le cadre de la Trisomie 21.

Chapitre 2

Quelle est l'origine de la diminution de la prolifération ?

Depuis quelques années, l'idée qu'une réduction de la prolifération puisse être à l'origine de multiples défauts du développement chez les patients porteurs de Trisomie 21 émerge. En effet, plusieurs auteurs ont décrit des modifications de la densité cellulaire et/ou directement du cycle cellulaire dans diverses régions du cerveau au cours du développement, principalement l'hippocampe et le cervelet, mais également dans le cortex cérébral et la peau (Contestabile et al., 2008; Contestabile et al., 2007; Chakrabarti et al., 2007; Guidi et al., 2007; Lorenzi and Reeves, 2006; Roper et al., 2006; Baxter et al., 2000).

Les futures analyses de la prolifération qui seront certainement menées dans différents tissus permettront de savoir si ce phénomène est propre au système nerveux et à la peau ou s'il touche l'ensemble de l'organisme. La question cruciale qu'il est important de poser concerne l'origine de cette diminution de la prolifération : est-elle due à l'état trisomique en lui même ? C'est à dire à la quantité supplémentaire d'ADN contenu dans le noyau ? Ou bien est-elle due à la surexpression de gènes spécifiques présents en 3 copies ?

2.1 Ce que nous apprennent les levures.

En 2007, Torres et al. (2007) ont publié la création d'une collection de souches de levures contenant une copie supplémentaire de chacun des chromosomes (2 chromosomes au lieu d'un seul) (Torres et al., 2007). L'analyse de l'expression des gènes par puce à ADN a révélé que pratiquement tous les gènes en 2 copies étaient exprimés et répondaient à l'effet du dosage génique. Les auteurs ont également observé que la majorité de ces souches de levure présentent des déficits de prolifération dus notamment à une élongation de la phase G_1 du cycle cellulaire. Ce retard d'entrée en phase S (réplication) serait corrélé avec le nombre de gènes en 2 copies. Ces différentes souches présentent également une augmentation de la consommation de glucose. Ce besoin accru d'énergie pourrait être dû à la transcription du segment supplémentaire d'ADN, à la traduction des ARNm correspondant ou bien à la dégradation des protéines présentes en trop grande quantité. Afin de savoir si les défauts de prolifération observés chez la levure étaient dus à la quantité d'ADN supplémentaire, les auteurs ont généré de nouvelles souches de levure en y introduisant différents YAC contenant des fragments d'ADN humain ou murin. Ces fragments n'étant pas sensés provoquer une forte activité transcriptionnelle dans les cellules de levures. Ces levures présentent une activité transcriptionnelle identique aux autres souches aneuploïdes, cependant aucune modification du cycle cellulaire n'a été observée suggérant que la présence seule d'ADN supplémentaire n'est pas responsable de la diminution de la prolifération. Plus étrangement, cette étude a révélé que chez la levure, la diploïdie, c'est à dire la présence d'une copie supplémentaire de tous les chromosomes, n'induit pas de modification de la prolifération. Ce phénomène se retrouve également dans le maïs où il a été rapporté que l'expression des gènes est beaucoup moins modifiée dans les cas de ploïdie que dans les modèles d'aneuploïdie (Guo et al., 1996; Birchler et al., 2005).

2.2 Une ou des modifications de la prolifération ?

Dès 2000 des études ont été menées chez la souris Ts16, le 1^{er} modèle murin de Trisomie 21 possédant 3 copies du chromosome 16 entier. Les auteurs ont rapporté une diminution du nombre des progéniteurs dans le néocortex d'embryons de souris Ts16. Ces cellules présentent également une élongation de la phase S du cycle cellulaire et un taux d'apoptose plus élevé (Haydar et al., 2000).

En 2007, 2 papiers issus d'un même laboratoire et présentant des analyses de la prolifération sur des tissus de fœtus humains (17-21 semaines) ont été publiés. Le premier rapporte une diminution d'environ 70% des cellules en prolifération dans le gyrus denté de l'hippocampe et d'environ 30% au niveau de la matrice germinale du ventricule latéral chez les fœtus porteurs de Trisomie 21. En utilisant des marqueurs spécifiques de la prolifération (Ki67, Cycline A et phospho-histone H3), les auteurs ont observé un nombre plus restreint de cellules en prolifération en phase S (réplication) et en phase M (mitose) et un plus grand nombre de cellules en phase G₂ (Contestabile et al., 2007). Le second papier confirme la diminution du nombre de cellules en prolifération avec une augmentation de l'apoptose. En fait, le nombre total de cellules (mitotiques ou post-mitotiques) est diminué dans cette structure. Enfin, le nombre de cellules de type astrocytaire est augmenté et le nombre de cellules neuronales diminué (Guidi et al., 2007).

Contestabile et al. (2007) ont également analysé la prolifération des progéniteurs au niveau de l'hippocampe de nouveau-nés Ts65Dn. Les auteurs ont retrouvé les résultats obtenus chez les embryons humains : diminution de la prolifération et augmentation du phénotype astrocytaire. Des résultats similaires avaient été publiés quelques mois auparavant sur des nouveau-nés et de jeunes adultes Ts65Dn chez lesquels avait été observée une diminution du nombre de cellules aux 2 stades et une diminution de la prolifération à P6 (Lorenzi and Reeves, 2006). L'analyse de la prolifération de fibroblastes *in vitro* et sur des coupes d'épiderme de souris Ts65Dn a également été menée. Il a été observé une diminution de la prolifération d'environ 30% caractérisée par un nombre plus restreint

de cellules en prolifération. Ces progéniteurs ne voient pas leur cycle cellulaire s'allonger mais sortent plus vite du stade mitotique que les cellules euploïdes (données non publiées, équipe du Dr. Ciani, University of Bologna, Italy).

Dans une récente étude, cette équipe s'est également intéressée à la prolifération dans le cervelet de nouveau-nés Ts65Dn. Ils ont mesuré une diminution de la prolifération des cellules granulaires de 40% ainsi qu'une élongation de 45% du cycle cellulaire, notamment les phases G₁ et G₂. Afin de trouver des gènes régulés chez les nouveau-nés Ts65Dn, les auteurs ont procédé à une analyse du transcriptome à l'aide de puces à ADN spécifiques de la prolifération. Ils ont isolé 2 gènes dont l'expression est diminuée dans le cervelet des nouveau-nés Ts65Dn : *Ccnb1* et *Skp2* (Contestabile et al., 2008). Cependant, ces 2 gènes, régulateurs de la transition G₁/S et G₂/M, ne sont pas significativement sous-exprimés dans nos propres données d'expression dans la couche granulaire externe de nouveau-nés Ts1Cje.

En 2007, Chakrabati et al. ont également analysé la neurogénèse au niveau du télencéphale chez la souris Ts65Dn. Ils ont rapporté un retard du développement du cortex cérébral et de l'hippocampe causé par un allongement du cycle cellulaire et une diminution de la prolifération des progéniteurs de la zone ventriculaire. Ce retard se traduit chez le nouveau-né par une diminution du nombre de cellules et une diminution de la synaptogénèse dans le néocortex.

Il semble donc que la réduction de la prolifération soit un phénomène fréquent chez les individus porteurs de Trisomie 21 et les modèles murins. Cependant le nombre de tissus testés reste faible, il s'agit en majorité du système nerveux. Il faut noter que les caractéristiques des modifications du cycle cellulaire ne sont pas constantes : augmentation de la phase G₁, de la phase G₂ ou bien de la phase M, cycle cellulaire inchangé mais nombre de progéniteurs réduit, réduction de la période mitotique des progéniteurs. A cela il faut ajouter que les modifications de la prolifération ne dépendent pas seulement de la localisation de la population cellulaire étudiée mais également du temps auquel elle est observée. Ainsi, si plusieurs études ont montré une diminution de la prolifération au

niveau de l'hippocampe chez des nouveau-nés Ts65Dn, Rueda et al. (2005) n'ont montré aucune différence de prolifération au niveau de l'hippocampe chez des souris Ts65Dn âgées de 3 à 5 mois puis de nouveau une diminution de la prolifération chez ces souris âgées de 13 à 15 mois (Rueda et al., 2005).

Enfin si l'on tient également compte de l'accroissement transitoire de la prolifération d'une population cellulaire spécifique dans la zone ventriculaire entre E14 et E16 chez la souris Ts65Dn (Chakrabarti et al., 2007), il apparaît que de multiples processus sont mis en jeu dans ces différentes populations cellulaires et à différents temps. Ces différences peuvent s'expliquer par les différents gènes que ces cellules expriment, en particulier les gènes en 3 copies, ainsi que le milieu dans lequel elles évoluent, permettant ou non ces modifications du cycle cellulaire.

Une étude intéressante est parue en 2006. Son but était de trouver l'origine de l'hypoplasie du cervelet chez la souris Ts65Dn. Les auteurs ont d'abord observé une diminution de l'index de prolifération des cellules granulaires à P0 mais pas à P6 (ce qui est cohérent avec nos propres résultats dans le modèle Ts1Cje). Puis ils ont testé la réponse mitotique de ces cellules à la voie de signalisation Sonic hedgehog (Shh) connue pour contrôler la prolifération des cellules granulaires au cours du développement du cervelet. Ils ont observé que les cellules granulaires Ts65Dn prolifèrent moins vite sous l'action de Shh que les cellules contrôles. Cette diminution de la sensibilité des cellules granulaire à Shh pourrait expliquer la diminution de la prolifération de ces cellules. Afin de tester cette hypothèse, un traitement systémique avec un agoniste de la voie Shh a été administré à des nouveau-nés Ts65Dn. Il a permis d'accroître l'index de prolifération des cellules granulaires dans le cervelet et de restaurer la population cellulaire en une semaine (Roper et al., 2006).

Cependant, à ce jour, aucun gène participant à la voie Shh n'a été localisé sur le chromosome 21 ni n'a été montré différenciellement exprimé chez les individus porteurs de Trisomie 21 ou des modèles murins. Aussi, il est possible que l'effet du traitement soit le résultat d'une sur-stimulation des récepteur Shh présents à la surface des cellules

granulaires. Il est également possible que des modifications de la voie Shh aient lieu à un niveau autre que transcriptionnel (traduction, maturation, transport...) Quoiqu'il en soit, cet essai est très prometteur. Il reste néanmoins à tester si le volume du cervelet des souris adultes Ts65Dn traitées est rétabli par ce traitement. De plus, des tests de comportement seront nécessaires afin de valider une possible amélioration des déficits comportementaux observés chez cette souris (Costa et al., 1999)

2.3 Trisomie 21 et cancer

Des modifications de la prolifération sont de plus en plus rapportées dans le cadre de la Trisomie 21, en général au cours du développement du système nerveux. L'origine de modification du cycle cellulaire n'est pas encore bien comprise mais il est intéressant de noter qu'il existe aussi une relation entre la Trisomie 21 et le cancer.

La Trisomie 21 constitue un facteur de risque élevé de cancer, notamment chez l'enfant (Windham et al., 1985; Narod et al., 1991). Il s'agit en général de leucémies myéloïdes aiguës ou lymphoblastoïdes aiguës. De fait, parmi les gènes portés par le chromosome 21 figurent les gènes *Runx1*, *Ets2* et *Erg* qui codent pour des facteurs de transcription. De multiples translocations de *Runx1* ont été répertoriées chez des patients atteints de leucémie et la surexpression de *Ets2* et *Erg* a été mise en cause chez des patients porteurs de Trisomie 21 et atteints de leucémie (Mikhail et al., 2004; Baldus et al., 2004). Un autre gène, *Tiam1* est surexprimé dans la moelle osseuse d'enfants atteints de leucémie et porteurs de Trisomie 21 et pourrait être à l'origine du risque 200 à 400 fois plus élevé de leucémies mégacaryoblastiques observées chez les enfants porteurs de Trisomie 21 (Ives et al., 1998). D'autres types de cancer tels que des lymphomes, des retinoblastomes, des cancers touchant les cellules germinales, le pancréas et les os présentent une incidence plus élevée chez les individus porteurs de Trisomie 21 (Satgé et al., 1998a).

Au contraire, il semble que les patients porteurs de Trisomie 21 soit 'protégés' de certaines tumeurs solides telles que les neuroblastomes et les néphroblastomes chez l'enfant.

En effet, si le neuroblastome constitue 6 à 10% des cancers chez l'enfant dans la population générale, quasiment aucun enfant porteur de Trisomie 21 n'a été diagnostiqué pour ce cancer. Chez l'adulte, les individus atteints de Trisomie 21 présentent une incidence plus faible des cancers dits gynécologiques et digestifs ainsi que du cancer du sein (Satgé et al., 1998b; Satgé et al., 2004). Deux gènes localisés sur le chromosome 21 pourraient jouer le rôle de gènes suppresseurs de tumeur : *Ets2* via la voie p53 et *S100β* (Wolvetang et al., 2003; Satgé et al., 1997).

Récemment, le rôle protecteur de la Trisomie 21 face aux tumeurs solides a été testé en croisant des souris Ts65Dn (modèle de la Trisomie 21) avec des souris portant une mutation sur le gène *Apc* provoquant la formation de nombreuses tumeurs au niveau de l'intestin (Sussan et al., 2008). Les auteurs ont observés une réduction d'environ 50% des tumeurs chez les souris Ts65Dn/*Apc*^{muté} par rapport aux souris *Apc*^{muté}. Les auteurs ont ensuite fait la même expérience en utilisant les 2 modèles Ts1Rhr et Ms1Rhr, respectivement trisomique et monosomique pour la région appelée DSCR et contenant environ 33 gènes en 3 copies. Ils ont de nouveau observé une diminution des tumeurs chez les souris Ts1Rhr contrairement aux souris Ms1Rhr qui présentent une augmentation de 100% des tumeurs. Parmi les gènes de la DSCR figure le gène *Ets2*. En neutralisant une des 3 copies d'*Ets2* chez les souris Ts1Rhr/*Apc*^{muté}, les auteurs ont constaté une augmentation des tumeurs de l'ordre de 80%, montrant ainsi que ce gène est responsable au moins en grande partie de la protection contre ces tumeurs.

Chapitre 3

Les modifications du transcriptome

Malgré un grand nombre d'analyses du transcriptome menées ces dernières années sur la Trisomie 21 (FitzPatrick et al., 2002; Mao et al., 2003; Saran et al., 2003; Amano et al., 2004; Giannone et al., 2004; Kahlem et al., 2004; Dauphinot et al., 2005; Mao et al., 2005; Lockstone et al., 2007; Ait Yahya-Graison et al., 2007; Sultan et al., 2007; Prandini et al., 2007), les résultats sont encore divergents en ce qui concerne l'étendue des modifications du transcriptome chez les individus porteurs de Trisomie 21 et les modèles murins. Les désaccords apparents entre ces études peuvent s'expliquer par les différences entre les tissus, les stades de développement ainsi que les technologies utilisées. Pour certaines études, le nombre d'échantillons utilisés est trop faible pour permettre l'élaboration de statistiques fiables.

Nous avons choisi de travailler sur le cervelet des souris Ts1Cje pour plusieurs raisons :

- Le cervelet est une région du cerveau bien caractérisée et qui présente un phénotype constant chez les individus porteurs de Trisomie 21.
- Ce phénotype est présent chez les souris Ts1Cje qui sont trisomiques pour environ $\frac{1}{3}$ des gènes du chromosome 21 humain, réduisant ainsi le nombre des gènes candidats.
- L'utilisation de tissus murins permet d'étudier plus facilement le développement du système nerveux.

- Les souris Ts1Cje se reproduisent assez facilement ce qui permet de travailler sur des animaux trisomiques et contrôles issus de mêmes portées, réduisant ainsi la variabilité des résultats.

Nous avons mené une étude du transcriptome à 4 stades du développement postnatal du cervelet. Cela nous a permis d'étudier les modifications du transcriptome au cours du temps et d'isoler des gènes potentiellement impliqués dans le développement du cervelet. Pour cela, nous avons mis au point un plan expérimental afin de pouvoir retirer un maximum d'informations de nos expériences tout en limitant le nombre d'hybridations à effectuer (figure 2.2 page 75).

Nous avons trouvé entre 372 et 1164 gènes différentiellement exprimés dans les souris Ts1Cje par rapport aux souris contrôles aux 4 stades du développement testés. Afin de contrôler le taux de faux positifs (type I d'erreur) qui peut être important dans ce type de test à comparaisons multiples nous avons voulu appliquer un test de correction appelé 'False Discovery rate' (FDR). Malheureusement cette procédure s'est montrée trop stringente pour nos données et n'a retenue aucun gène significatif. Nous avons essayé de modifier les paramètres du test de Benjamini et Hochberg afin de le rendre plus tolérant mais sans succès.

Au regard de ces résultats, d'autres conclusions sont possibles :

- Si aucun gène n'est validé par les tests de Bonferroni et de Benjamini et Hochberg, cela signifie qu'aucun gène n'est spécifiquement régulé dans les souris Ts1Cje.
- Ou bien l'expression d'un certain nombre de gènes est modifiée mais de façon trop subtile et/ou trop variable pour pouvoir être décelée par des tests statistiques poussés.

La première hypothèse semble d'emblée improbable car la cause des phénotypes observés chez les souris Ts1Cje (à fortiori les individus porteurs de Trisomie 21) est la présence de gènes en 3 copies. Or si ces gènes supplémentaires ne sont pas exprimés comment peuvent-ils induire tous ces phénotypes ?

La seconde hypothèse est plus intéressante car elle rejoint le débat sur l'effet spéci-

fique ou non spécifique de la trisomie sur l'expression des gènes. En effet, une grande variabilité des modifications de l'expression des gènes semble indiquer un effet aléatoire de la trisomie ce qui appuierait l'hypothèse de la rupture de l'homéostasie de Shapiro (Shapiro, 1983; Shapiro, 2001). Concernant les gènes en 2 copies, cette hypothèse est invérifiable, en effet comment décider qu'un rapport d'expression est 'vrai', 'réel', si les tests statistiques sont incapables de trancher ? Cependant, il faut remarquer qu'aucun gène présent en 3 copies n'a également été validé par le FDR. Or il est aujourd'hui admis que les gènes en 3 copies, ou au moins une partie, sont soumis à l'effet de dosage génique et sont donc sur-exprimés. De plus, nous avons testé par PCR quantitative l'expression de plusieurs gènes en 3 copies à P0 (*Dscam*, *Rcan1*, *Dyrk1a*, *Hmg14*, *Girk2*, *Olig1* et *Son*) à partir des mêmes échantillons d'ARN que ceux hybridés sur les puces. Tous ces gènes ont été trouvés significativement sur-exprimés avec des rapports d'expression proches de 1,5. Cela montre bien qu'il existe bien des gènes significativement différentiellement exprimés dans les souris Ts1Cje mais que les tests de correction des p-valeurs sont trop stringents pour les valider.

Lorsque l'on regarde les résultats de l'ANOVA, non corrigés par le FDR et donc à priori sur-estimés, on remarque qu'une minorité des gènes exprimés sont spécifiquement régulés chez les souris Ts1Cje suggérant que la trisomie ne provoque pas de déstabilisation globale du transcriptome dans le cervelet des souris Ts1Cje.

Afin d'étudier plus précisément les modifications du transcriptome dans la couche granulaire externe où nous avons observé une diminution de la prolifération des progéniteurs des cellules granulaires à la naissance, nous avons pratiqué des dissections de la couche externe du cervelet de souris Ts1Cje et contrôles à P0.

La classification hiérarchique des 18 puces (figure 3.4 page 99) a montré que les échantillons avaient tendance à se regrouper en fonction de leur portée d'origine et/ou de la lame sur laquelle ils ont été hybridés. Nous avons donc procédé à une normalisation des 18 puces par la moyenne

Après normalisation nous avons à nouveau tenté de grouper les échantillons par classification hiérarchique. Si l'on considère l'expression des seuls gènes en 3 copies, les échantillons Ts1Cje et contrôles sont parfaitement clusterisés. Ce dernier résultat n'est pas étonnant puisque tous les gènes en 3 copies exprimés sont significativement surexprimés dans la couche granulaire externe du cervelet chez les souris Ts1Cje.

Par contre, comme pour le cervelet entier, il est impossible de séparer les échantillons Ts1Cje et contrôles en considérant l'expression de l'ensemble des gènes, ou uniquement des gènes en 2 copies ou bien d'un groupe de gènes en 2 copies, par exemple les gènes du chromosome 1. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus dans le laboratoire du Pr. Roger Reeves (Johns Hopkins University, USA). L'application d'une classification hiérarchique sur des échantillons extraits de cultures de cellules granulaires de souris Ts65Dn et contrôles, permet de séparer les échantillons Ts65Dn et les échantillons contrôles. Cette classification est possible en considérant l'ensemble du génome ou n'importe quel sous-ensemble de gènes en 2 copies (Pr. Roger Reeves, communication personnelle). Si ces résultats devaient être confirmés, ils seraient cohérents avec l'étude du transcriptome de Saran et al. (2003) qui avait rapporté une déstabilisation globale du transcriptome dans le cervelet de souris Ts65Dn.

Bien que ces résultats soient issus de 2 modèles murins différents, il serait étonnant qu'une déstabilisation de grande ampleur ait lieu dans l'un des modèles et qu'un effet très limité sur les gènes en 2 copies soit présent dans l'autre. Aussi, serait-il intéressant de connaître les conditions d'expériences précises ainsi que les paramètres choisis pour chaque test statistique. Cela permettrait peut-être de savoir si les différences observées sont réelles ou si un biais existe dans une des 2 analyses ou bien si les différences découlent simplement du choix de la stringence et de la pertinence des tests choisis et de leur interprétation.

Deux hypothèses sont d'ores et déjà envisageable :

1. Les résultats du Pr. Reeves ont été obtenus à partir d'ARN extraits de cellules en culture. Il est donc possible que les conditions expérimentales soient à l'origine

d'un biais. Dans ce cas, il s'agit de cultures de cellules granulaires. Or ces cellules ne survivent *in vitro* qu'en présence d'une concentration élevée en KCl. On peut donc se demander si les cellules issues de souris Ts65Dn ne sont pas plus sensibles à cette concentration saline élevée. La déstabilisation globale du génome rapportée serait dans ce cas un artefact d'expérience.

2. Une seconde hypothèse serait que les conditions de notre expérience nous empêchent d'observer cette déstabilisation globale. En effet, nous avons travaillé sur des cerveaux disséqués et non sur des cultures de cellules granulaire pour être au plus près des conditions physiologiques. Or la classification hiérarchique ainsi que la représentation des échantillons de couches externes de souris Ts1Cje et contrôles par ACP ont montrés que même après normalisation les échantillons se regroupaient par portées d'origine et non par génotype. On peut donc imaginer qu'en travaillant sur des portées légèrement différentes nous n'avons pu observer que les modifications du transcriptome communes aux 3 portées, c'est à dire l'effet primaire de dosage génique. Les modifications d'expression plus subtiles des gènes en 2 copies étant alors impossibles à détecter car trop variable selon les portées.

Afin de distinguer les gènes différentiellement exprimés chez les souris Ts1Cje, nous avons comparé l'expression de chaque gène entre les souris Ts1Cje et contrôles avec le test de Student (*t* test) avec une marge d'erreur de type I de 5%. Nous avons obtenu 479 gènes significatifs. Nous avons à nouveau utiliser la méthode de correction de Benjamini et Hochberg afin de ne garder que les gènes réellement significatifs. Nous avons alors obtenu une liste réduite de 33 gènes dont plus des $\frac{2}{3}$ sont des gènes présents en 3 copies dans la souris Ts1Cje. Ce résultat est concordant avec la première analyse du transcriptome dans le cervelet entier puisque que nous ne détectons pas de déstabilisation globale du transcriptome.

Par contre, concernant les gènes en 3 copies les résultats sont plus divergents. En effet, si seulement 23 gènes sont trouvés significativement surexprimés après la correction de Benjamini et Hochberg, tous les gènes en 3 copies exprimés dans la couche externe sont

significativement surexprimés d'après le test de Student avec un rapport moyen d'environ 1,38. A l'inverse, dans le cervelet entier seuls 12 gènes en 3 copies sont significativement surexprimés d'après le test de Student avec des rapports d'expression proches de 1,5. La majorité des gènes en 3 copies (59) présentaient des rapports d'expression entre 0,6 et 1,67 mais avec des p-valeurs supérieures à 0,05. Ces différences peuvent être dues aux tissus étudiés, les dissections de couches granulaires externes plus homogènes, enrichies en cellules granulaires alors que le cervelet est composé de plusieurs types cellulaires, neuronaux et gliaux.

Les différences peuvent également être dues à l'utilisation de 2 types de puces à ADN différents. En effet, comme nous l'avons vu, les puces Illumina donnent des résultats plus robustes et répétitifs alors que les puces RNG/MRC, plus sensibles, présentent beaucoup plus de variabilité, ce qui pourrait expliquer pourquoi peu de gènes en 3 copies sont trouvés significatifs par le test de Student et pourquoi aucun gène en 2 ou 3 copies n'est assez significatif dans le cervelet pour être validé par la correction de Benjamini et Hochberg.

Chapitre 4

A la recherche des gènes candidats

4.1 Des stratégies mises en œuvre.

L'identification de gènes par des expériences de puces à ADN peut ressembler à première vue à la recherche d'«une aiguille dans une botte de foin». Nous avons discuté dans les chapitres précédents de l'importance du choix des tissus analysés et des technologies utilisées. Nous avons également abordé la mise au point des plans d'expériences qui sont cruciaux pour pouvoir retirer un maximum d'informations ainsi que le choix et l'interprétation des tests statistiques adoptés.

C'est grâce à ces choix que l'on peut espérer retirer une information pertinente et juste de nos expériences. Nos 2 analyses nous ont permis d'établir des listes de gènes spécifiquement régulés dans les souris Ts1Cje. Quelques centaines de gènes ont été sélectionnés par le test de Student. Une trentaine ont été conservés après la procédure de Benjamini et Hochberg. Je traiterai donc ici des stratégies que nous avons mis au point afin de sélectionner les gènes les plus pertinents.

Du point de vue conceptuel, on peut dire que nous avons adopté 2 stratégies principales :

1. Une recherche non supervisée des gènes spécifiquement régulés chez les souris Ts1Cje et donc potentiellement impliqués dans l'hypoplasie du cervelet.
2. Et l'analyse de gènes spécifiques sélectionnés grâce aux données de la littérature.

Concernant la 2^{nde} méthode, nous avons sélectionné 22 gènes qui ont soit été décrits comme jouant un rôle dans la prolifération des cellules granulaires du cervelet, soit parce qu'ils ont été impliqués dans l'hypoplasie du cervelet dans des modèles murins de Trisomie 21. Pour plus de précision nous avons testé l'expression de ces gènes par PCR quantitative. Parmi ces gènes seuls les gènes présents en 3 copies sont significativement sur-exprimés d'environ 1,5 fois (*Dscam*, *Dyrk1a*, *Hmgn1*, *Rcan1*, *Girk2* et *Son*). Parmi les gènes en 2 copies seuls *Shh* et son récepteur *Ptch1* sont légèrement mais significativement surexprimés (1,16 et 1,08 respectivement). Ces légères surexpressions peuvent suggérer une sur-activation de la voie Shh, peut-être en réponse à une réduction de la sensibilité des cellules granulaires à Shh comme cela a été rapporté dans le modèle Ts65Dn (Roper et al., 2006). Les résultats de PCRq indiquent en tout cas que les gènes en 2 copies testés ne sont pas impliqués dans l'hypoplasie du cervelet, du moins pas au niveau transcriptionnel et justifie l'analyse du transcriptome à l'aide de puces pangénomiques pour trouver de nouvelles cibles.

Comme dit plus haut, les analyses du transcriptome de la couche externe du cervelet ont montré un effet prépondérant de dosage génique sur la transcription des gènes. Ainsi il semblerait que les gènes en cause soient en 3 copies dans la souris Ts1Cje. Parmi ces gènes, 2 avaient déjà été proposés comme gènes candidats pour l'hypoplasie du cervelet : *Hmgn1* et *Son* (Dauphinot et al., 2005; Potier et al., 2006).

Enfin, notre analyse du transcriptome à travers le développement postnatal du cervelet nous a permis d'identifier de nouveaux gènes candidat. En effet, grâce à notre plan d'expérience, nous avons été en mesure d'estimer les régulations d'expression des gènes chez les souris Ts1Cje mais aussi les régulations des gènes au cours du développement normal du cervelet. Ces derniers sont potentiellement impliqués dans le développement du cervelet.

Ainsi en croisant ces 2 effets, nous avons établis la liste des 1187 gènes régulés au cours du développement du cervelet mais également spécifiquement régulés dans le cervelet des souris Trisomiques. Parmi ces gènes seuls 3 sont présents en 3 copies dans la

souris Ts1Cje : *Girk2*, *Olig1* et *Dscam*.

Nous avons également recherché des gènes candidats en nous servant de l'ontologie des gènes régulés chez les souris Ts1Cje lorsqu'elle existe. Nous avons pour cela dresser des listes de gènes dont au moins une référence dans la 'Gene Ontology database' concerne la prolifération ou la différenciation. Malheureusement ces recherches ont été infructueuses. Nous avons obtenu des gènes liés à la prolifération certes, mais jamais dans toutes les portées. Il est donc possible que ces résultats ne soient absolument pas pertinents car reflétant un rapport d'expression stochastique uniquement vrai à un instant t, ou encore que certains de ces gènes soient effectivement régulés chez les animaux Ts1Cje mais les cellules et à fortiori les animaux des différentes portées n'étant pas synchronisées, ces résultats ne sont pas reproductibles.

Une autre complexité dans cette analyse est que nous travaillons sur un organe en plein développement. Il est donc difficile de comparer des animaux et plus encore des portées d'animaux car ils ne sont certainement pas tous au même stade du développement du cervelet. D'autant plus que le stade qui nous intéresse se situe le jour de la naissance. En fonction de l'heure de mise à bas des souriceaux, l'âge précis des animaux au moment de la dissection était légèrement différent. Enfin, la capacité à se mouvoir et à se nourrir à la naissance peut éventuellement influencer le développement des souriceaux au stade néonatal.

4.2 Etablissement du gène candidat.

Au fil de nos analyses nous avons pu dresser un profil des gènes candidats :

- Ces gènes sont probablement présents en 3 copies chez les souris Ts1Cje.
- Ces gènes sont spécifiquement régulés chez les souris Ts1Cje.
- Ces gènes sont potentiellement régulés au cours du développement postnatal du cervelet.

Il se trouve qu'un seul gène répond positivement à toutes ces caractéristiques : *Girk2*. En effet *Girk2* est présent en 3 copies chez les souris Ts1Cje. Il est surexprimé dans la couche granulaire externe du cervelet à P0 avec un rapport d'expression de 1,58 significatif d'après le test de Student. De plus, *Girk2* est le seul gène (en 2 ou 3 copies) à être spécifiquement régulé à tous les temps dans le cervelet des souris Ts1Cje et tout au long du développement postnatal du cervelet avec des rapport d'expression de 1,21 à P0, 1,40 à P3, 1,31 à P7 et 1,29 à P10 chez les souris Ts1Cje par rapport aux souris contrôles et des rapports d'expression au cours du développement de 1,50 entre P0 et p3, 3,31 entre P0 et P3 et 3,11 entre P0 et P10. Sa surexpression à P0 a été confirmée par PCR quantitative avec un rapport d'expression supérieur à 1,5.

Girk2 ('G protein-gated inwardly rectifying K⁺ channel'), aussi connu sous le nom de *Kcnj6*, code pour une sous-unité d'un canal potassium (K⁺), fonctionnel sous forme d'hétéropolymères et dont l'ouverture requiert l'activation d'une protéine G. Il constitue avec *Girk1*, *Girk3* et *Girk4* la sous-famille Kir3. Chez la Souris, *Girk2* est très exprimé dans le cervelet et le mésencéphale où l'hétéropolymère actif est composé de GIRK1 et de GIRK2. Dans le cervelet, *Girk2* est exprimé dans les cellules granulaires et les cellules de Purkinje (Patil et al., 1995; Duprat et al., 1995; Lesage et al., 1995). *Girk2* est également exprimé au cours du développement du cervelet chez l'Homme. Thiery et al. (2003) ont observé son expression chez des fœtus humains de 17 et 33 semaines de développement au niveau des couches granulaires interne et externe du cervelet. L'expression de *Girk2* est également observée dans la couche des cellules de Purkinje mais il s'agit de cellules granulaires migrant de la couche granulaire externe vers la couche granulaire interne et non des cellules de Purkinje (Thiery et al., 2003).

Les souris transgéniques dépourvues du gène *Girk2* sous-expriment également *Girk1* mais ne présentent pas de défaut du développement du cervelet (Signorini et al., 1997). Au contraire, les souris 'weaver' (wv) qui possèdent une version mutée de *Girk2* (substitution d'un acide aminé glycine par une sérine dans la région H5) présentent une déplétion sévère des cellules granulaires du cervelet, des cellules pycnotiques sont observables dès

la naissance. Cette mutation provoque une perte de la sélectivité du canal au K^+ et devient perméable aux ions sodium (Na^+) et calcium (Ca^{2+}) induisant de ce fait une dépolarisation de la membrane cellulaire (Tong et al., 1996; Slesinger et al., 1996).

Malheureusement, pratiquement toutes les études fonctionnelles sur GIRK2 ont été faites en utilisant soit des souris dépourvues du gène, soit des souris possédant une version mutée. Il n'existe pas de souris surexprimant *Girk2* comme c'est le cas dans les souris Ts1Cje. Toutefois, l'équipe du Pr. Galdzicki (Bethesda, USA) a publié 2 études sur *Girk2* chez les souris Ts65Dn. Harashima et al. (2006) ont montré que *Girk2* est surexprimé dans le cerveau des souris Ts65Dn et que la quantité de protéine synthétisée est proportionnelle à celle de son messenger, notamment dans le cervelet (Harashima et al., 2006). Par la suite, Best et al. (2007) ont mis en évidence une conséquence fonctionnelle à l'augmentation d'expression de *Girk2* en observant un accroissement significatif (+100%) du courant GIRK médié par le $GABA_B$ dans des cultures primaires de neurones de l'hippocampe. Cet accroissement du courant GIRK n'est pas dû à une augmentation de la conductance des canaux GIRK mais à une densité accrue de canaux dans les cellules (Best et al., 2007).

Afin de montrer que la synthèse de GIRK2 suit le dosage génique, Harashima et al. avaient généré des souris Ts65Dn ne possédant que 2 copies de *Girk2*. Il est dommage que Best et al. n'aient pas également utilisé ce modèle. En effet, il existe peut-être d'autres gènes en 3 copies dans les souris Ts65Dn qui peuvent jouer un rôle dans l'établissement du potentiel de membrane par exemple.

Dans le cervelet, les canaux potassium fonctionnels sont constitués des sous-unités *Girk1* et *Girk2* (Thiery et al., 2003). Nous n'avons pas détecté l'expression de *Girk1* dans la couche granulaire externe. Il serait intéressant de vérifier ce résultat par PCR quantitative. Cependant, nous avons détecté l'expression de *Girk1* dans le cervelet tout au long du développement entre P0 et P10. Les souris transgéniques dépourvues du gène *Girk2* sous-expriment également *Girk1* (Signorini et al., 1997). Notre analyse du transcriptome n'a pas été en mesure de montrer une sur-expression de *Girk1* chez les souris Ts1Cje. Par contre, entre P0 et P10 *Girk1* est régulé de la même manière que *Girk2* (rapport d'expres-

sion de 1,48 entre P0 et P3, 1,83 entre P0 et P10, 2,56 entre P0 et 10).

Eu égard à ce qu'observe Best et al. (2007) dans l'hippocampe, il est possible que la surexpression de *Girk2* provoque une augmentation du nombre de canaux potassium à la surface des cellules granulaires. Cependant, en l'absence de surexpression de *Girk1*, la stochiométrie de ces canaux sera vraisemblablement modifiée avec une augmentation des homopolymère de GIRK2. Selon Thiery et al. (2007), de tels canaux sont fonctionnels. Cependant il serait intéressant de savoir s'il possèdent les même caractéristiques en terme de sélectivité des ions, d'activation et d'interaction avec les protéines G.

Best et al. (2007) n'a pas observé de modification du potentiel de membrane de base au niveau de l'hippocampe. Il faudra vérifier que cela est vrai également pour les cellules granulaires du cervelet. Il est toute fois possible que le maintien du potentiel de membrane soit du à un effet de compensation par l'activation et/ou la désactivation d'autres types de canaux ioniques. Cela pourrait avoir comme conséquence une modification de la concentration des ions concernés.

La prolifération des cellules granulaires du cervelet dépend notamment de la concentration intra-cellulaire en ion calcium (Nakanishi and Okazawa, 2006). Les ions calcium provoque l'activation de la calcineurine phosphatase qui induit l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le développement des cellules granulaires. Parmi ces gènes figurent *Dscr1* et *Dyrk1a* qui sont présent en 3 copie dans les souris Ts1Cje (Moldrich et al., 2007).

Conclusions et Perspectives

L'analyse du transcriptome dans le cervelet d'un grand nombre de souris Ts1Cje et contrôles nous a permis de montrer un effet majeur de dosage génique des gènes présents en 3 copies. Ce dosage génique a des conséquences limitées sur l'expression des gènes disomiques au cours du développement postnatal du cervelet.

Les progéniteurs des cellules granulaire, localisées dans la couches granulaire externe au stade postnatal, prolifèrent moins vite chez les souris Ts1Cje. En analysant le transcriptome de populations cellulaires enrichies en progéniteurs nous avons observé qu'une grande majorité des gènes différentiellement régulés était présents en 3 copies. Ces résultats suggèrent donc que des gènes en 3 copies sont potentiellement responsables de l'hypoplasie du cervelet que nous avons mesuré chez les souris Ts1Cje adultes.

En comparant les effets de la trisomie et du développement sur l'expression des gènes, nous avons identifié seulement 6 gènes en 3 copies surexprimés chez les souris Ts1Cje aux 4 stades du développement. Nous avons d'autre part identifié 3 gènes présents en 3 copies surexprimés chez les souris Ts1Cje et également régulés au cours du développement postnatal normal du cervelet.

Girk2 fait parti de ces 2 listes de gènes. Plusieurs arguments suggèrent que la surexpression de cette sous-unité d'un canal potassium dans les cellules granulaires pourrait être responsable de l'hypoplasie cérébelleuse observée dans les modèles murins et les patients atteints de trisomie 21.

Afin de vérifier que *Girk2* est responsable de l'hypoplasie ou bien qu'il y participe, nous proposons la construction de souris Ts1Cje possédant uniquement 2 copies de *Girk2* par croisement de souris Ts1Cje avec des souris dépourvues du gène *Girk2*. Dans ce

modèle, le volume du cervelet ne devrait pas être modifié. En fait, des souris Ts65Dn ne possédant que 2 copies de *Girk2* ont déjà été produites mais le volume du cervelet n'a pas été évalué dans ce modèle et la colonie n'a pas été maintenue.

Si la précédente expérience est concluante, des expériences complémentaires seront nécessaires afin d'identifier comment la surexpression de *Girk2* peut provoquer cette hypoplasie.

Dans un premier temps, une quantification de la protéine GIRK2 sera indispensable pour mesurer dans quelle proportion la quantité de protéine GIRK2 est corrélée avec l'expression de son gène comme dans l'hippocampe des souris Ts65Dn.

Puis dans un second temps, il sera intéressant de caractériser la stochiométrie des canaux GIRK présents à la surface des cellules granulaires ainsi que leur fonctionnement. Pour cela des enregistrements électrophysiologiques des cellules granulaires seront nécessaires afin de mesurer les courants GIRK ainsi que le potentiel de membrane des cellules granulaires.

Nous avons évoqué un rôle potentiel du calcium qui joue un rôle important dans la régulation de la prolifération des cellules granulaires. Nous proposons donc de quantifier les niveaux de calcium intracellulaire dans cellules granulaires de souris Ts1Cje et contrôles.

Enfin, afin de mesurer les capacités prolifératives des précurseurs des cellules granulaires chez les souris Ts1Cje et d'identifier des gènes supplémentaires régulés chez ces souris, nous proposons d'effectuer une nouvelle analyse du transcriptome de cultures de cellules granulaires de souris Ts1Cje et contrôles à différents temps du cycle cellulaire. La culture *in vitro* de ces cellules permettrait de les synchroniser et ainsi d'identifier des gènes finement régulés au cours de la mitose.

Annexes

Annexes A

<i>Symbol</i>	P0	<i>p</i>	P3	<i>p</i>	P7	<i>p</i>	P10	<i>p</i>	P0→P3	<i>p</i>	P0→P7	<i>p</i>	P0→P10	<i>p</i>
<i>Cbr3</i>	1,67	0,078	0,83	0,411	1,04	0,775	0,83	0,386	1,53	0,171	1,60	0,188	1,63	0,244
<i>Donson</i>	1,65	0,156	0,91	0,586	1,61	0,050	0,99	0,970	1,98	0,168	1,26	0,652	1,86	0,330
<i>Son</i>	1,63	0,020	1,35	0,161	1,39	0,059	1,55	0,041	1,61	0,123	1,35	0,454	1,23	0,627
<i>Sod1</i>	1,56	0,001	1,43	0,002	1,89	0,000	1,64	0,001	1,30	0,075	0,69	0,053	0,72	0,160
<i>Hlcs</i>	1,53	0,042	0,87	0,432	1,02	0,932	1,06	0,801	1,68	0,123	1,97	0,090	2,66	0,056
<i>I810053B23Rik</i>	1,51	0,028	1,15	0,531	1,08	0,560	1,10	0,486	1,33	0,234	1,04	0,920	1,09	0,831
<i>Pcp4</i>	1,50	0,009	1,41	0,013	1,70	0,000	1,53	0,020	0,94	0,719	0,82	0,351	1,34	0,272
<i>Olig1</i>	1,47	0,001	0,91	0,324	1,34	0,007	1,21	0,221	1,88	0,000	0,83	0,269	0,60	0,069
<i>Cbr1</i>	1,36	0,050	1,25	0,071	1,29	0,037	1,01	0,912	1,47	0,201	1,60	0,180	1,76	0,142
<i>Tmem50b</i>	1,34	0,236	1,52	0,102	1,50	0,083	1,04	0,852	0,62	0,158	0,55	0,222	0,62	0,453
<i>IfnEr2</i>	1,33	0,022	0,96	0,750	0,90	0,327	1,04	0,807	0,87	0,462	0,87	0,562	0,91	0,780
<i>Son</i>	1,32	0,004	1,48	0,000	1,60	0,000	1,53	0,000	1,13	0,296	1,18	0,266	1,16	0,457
<i>Dyrk1a</i>	1,31	0,008	1,08	0,339	1,24	0,010	1,07	0,448	1,13	0,281	0,91	0,491	1,05	0,769
<i>I1110004E09Rik</i>	1,29	0,400	1,73	0,065	1,18	0,264	1,08	0,717	1,34	0,495	1,64	0,338	1,52	0,470
<i>Atp5o</i>	1,27	0,034	1,26	0,015	1,59	0,000	1,46	0,002	1,28	0,065	0,96	0,778	1,02	0,919
<i>Ifngr2</i>	1,26	0,026	1,51	0,001	1,28	0,043	1,47	0,009	0,97	0,781	0,78	0,130	0,74	0,174
<i>I1110008E08Rik</i>	1,22	0,191	1,12	0,424	0,83	0,197	1,30	0,149	1,03	0,878	1,48	0,135	1,37	0,331
<i>Itsn1</i>	1,22	0,088	1,36	0,008	1,09	0,445	1,33	0,042	1,08	0,618	1,39	0,100	1,55	0,082
<i>Zfp295</i>	1,22	0,145	1,20	0,117	1,19	0,151	1,17	0,401	1,29	0,123	1,08	0,711	0,82	0,546
<i>Girk2</i>	1,21	0,048	1,40	0,001	1,31	0,006	1,29	0,025	1,50	0,003	3,31	0,000	3,11	0,000
<i>Cryz1l</i>	1,21	0,091	1,33	0,046	1,49	0,009	0,93	0,527	0,81	0,340	0,78	0,321	1,04	0,889
<i>Ttc3</i>	1,20	0,332	1,21	0,260	1,32	0,151	0,95	0,821	0,79	0,369	0,75	0,364	0,65	0,322
<i>Tmprss2</i>	1,19	0,700	1,01	0,976	0,70	0,290	0,80	0,569	0,72	0,502	0,50	0,268	0,30	0,130
<i>Gart</i>	1,17	0,245	1,22	0,094	1,38	0,012	1,52	0,008	1,29	0,137	1,32	0,186	1,27	0,403
<i>IfnEr1</i>	1,17	0,308	1,14	0,356	1,33	0,079	1,31	0,177	1,18	0,426	0,86	0,571	0,97	0,933
<i>662040ID04Rik</i>	1,15	0,404	0,94	0,780	0,85	0,297	1,00	0,982	1,00	0,984	0,52	0,054	0,53	0,110

TABLE 1.1: Ratios d'expression des gènes en 3 copies au cours du développement du cervelet - Patie I. NE : non exprimé. En magenta, les valeurs significatives (ANOVA).

<i>Symbol</i>	P0	<i>p</i>	P3	<i>p</i>	P7	<i>p</i>	P10	<i>p</i>	P0→P3	<i>p</i>	P0→P7	<i>p</i>	P0→P10	<i>p</i>
<i>Itgb2l</i>	1,15	0,310	1,06	0,673	0,84	0,237	0,87	0,322	0,89	0,548	1,25	0,423	1,47	0,236
<i>Mtps6</i>	1,14	0,386	0,85	0,348	1,49	0,028	1,13	0,526	1,45	0,149	0,79	0,479	0,96	0,925
<i>5730405K23Rik</i>	1,13	0,374	1,39	0,013	1,14	0,257	1,07	0,534	0,75	0,089	0,95	0,828	1,06	0,838
<i>Mx1</i>	1,12	0,382	0,99	0,939	0,96	0,714	1,06	0,721	0,96	0,826	1,08	0,721	1,17	0,580
<i>Dscam</i>	1,12	0,123	1,41	0,000	1,07	0,328	1,18	0,034	0,76	0,010	1,23	0,109	1,34	0,070
<i>Dscr5</i>	1,12	0,718	0,87	0,437	1,43	0,062	1,03	0,886	1,09	0,847	0,78	0,303	NE	NE
<i>2310043M15Rik</i>	1,12	0,721	1,01	0,972	1,01	0,973	1,18	0,597	1,31	0,613	2,03	0,298	2,01	0,383
<i>ORF9</i>	1,11	0,656	0,89	0,633	0,85	0,468	1,13	0,648	1,44	0,218	0,91	0,788	0,75	0,559
<i>4930563D23Rik</i>	1,11	0,515	0,75	0,175	1,04	0,732	1,09	0,650	1,46	0,269	1,07	0,839	1,05	0,891
<i>Cldn14</i>	1,10	0,579	1,01	0,928	0,93	0,542	1,18	0,290	1,46	0,212	1,03	0,933	0,92	0,846
<i>Rcan1</i>	1,10	0,524	1,23	0,139	1,11	0,417	1,03	0,847	1,10	0,587	1,21	0,407	1,36	0,328
<i>Slc5a3</i>	1,08	0,572	1,01	0,933	1,10	0,448	0,95	0,742	1,15	0,496	0,92	0,753	0,98	0,952
<i>Dscr2</i>	1,07	0,858	1,02	0,961	1,13	0,723	1,38	0,215	0,85	0,752	1,03	0,956	1,24	0,753
<i>Ets2</i>	1,06	0,829	0,80	0,383	1,21	0,414	1,22	0,473	1,08	0,812	0,64	0,300	0,52	0,211
<i>Chaf1b</i>	1,06	0,741	1,27	0,140	1,14	0,347	1,20	0,286	1,14	0,519	1,42	0,147	1,82	0,072
<i>runx1</i>	1,06	0,828	0,92	0,680	1,29	0,208	1,07	0,835	1,26	0,432	0,68	0,378	1,29	0,652
<i>A930006K02Rik</i>	1,05	0,805	0,84	0,310	0,91	0,613	0,61	0,298	0,89	0,610	0,82	0,469	0,78	0,511
<i>ORF28</i>	1,03	0,768	0,99	0,920	1,05	0,627	1,09	0,425	1,02	0,857	1,31	0,145	1,18	0,454
<i>Olig2</i>	1,02	0,773	1,01	0,826	1,07	0,237	1,18	0,037	1,00	0,987	1,00	0,997	1,19	0,203
<i>Sh3bgr</i>	1,02	0,840	0,88	0,221	0,92	0,452	1,00	0,977	1,04	0,775	0,74	0,104	0,73	0,143
<i>AA517739</i>	1,01	0,886	0,71	0,107	0,98	0,856	0,97	0,771	0,81	0,344	0,95	0,881	0,95	0,880
<i>Hunk</i>	1,01	0,922	1,08	0,516	1,16	0,230	1,12	0,536	0,74	0,137	0,83	0,455	1,00	0,996
<i>B3galt5</i>	1,01	0,951	1,27	0,011	1,14	0,186	1,15	0,232	0,89	0,364	0,96	0,797	0,95	0,828
<i>Sim2</i>	0,99	0,963	0,81	0,194	0,95	0,733	0,77	0,222	1,10	0,598	0,50	0,009	0,39	0,010
<i>mK1AA0910</i>	0,99	0,928	1,35	0,041	0,98	0,900	1,25	0,157	0,98	0,904	1,46	0,141	1,35	0,357
<i>5830404H04Rik</i>	0,97	0,844	1,35	0,111	1,06	0,674	0,92	0,665	0,83	0,397	0,90	0,696	1,13	0,739

TABLE 1.2: Ratios d'expression des gènes en 3 copies au cours du développement du cervelet - Partie II. NE : non exprimé. En magenta, les valeurs significatives (ANOVA).

<i>Symbol</i>	P0	<i>p</i>	P3	<i>p</i>	P7	<i>p</i>	P10	<i>p</i>	P0→P3	<i>p</i>	P0→P7	<i>p</i>	P0→P10	<i>p</i>
<i>I810007M14Rik</i>	0,97	0,869	1,14	0,476	1,35	0,088	1,12	0,585	0,80	0,376	0,78	0,428	0,78	0,548
<i>Il10rb</i>	0,96	0,782	0,94	0,667	1,06	0,663	1,08	0,642	1,48	0,089	1,48	0,160	1,53	0,279
<i>B3galt5</i>	0,96	0,862	0,90	0,702	1,16	0,541	1,19	0,631	0,87	0,697	0,63	0,293	0,65	0,476
<i>4930534H18Rik</i>	0,95	0,730	1,00	0,990	1,12	0,397	1,05	0,761	1,27	0,203	1,07	0,766	1,39	0,274
<i>C21orf63</i>	0,92	0,602	1,14	0,400	1,10	0,502	0,96	0,893	0,54	0,026	0,58	0,103	0,71	0,447
<i>Ripk4</i>	0,92	0,712	1,14	0,694	0,95	0,778	1,05	0,842	0,63	0,164	0,91	0,837	0,69	0,510
<i>Prdm15</i>	0,92	0,563	1,32	0,088	0,99	0,922	0,91	0,593	0,67	0,050	0,80	0,374	0,68	0,253
<i>Girk2</i>	0,90	0,234	1,17	0,033	1,15	0,066	1,25	0,019	0,82	0,068	1,14	0,323	1,14	0,411
<i>H3f3a</i>	0,89	0,215	0,86	0,102	1,00	0,975	0,96	0,760	1,19	0,190	1,39	0,088	1,27	0,258
<i>Brwd1</i>	0,89	0,657	1,01	0,975	1,13	0,407	1,03	0,846	0,79	0,506	1,19	0,599	1,05	0,900
<i>Dscr6</i>	0,88	0,400	0,95	0,698	1,00	0,992	0,84	0,285	0,96	0,818	0,71	0,173	0,70	0,247
<i>Kcne1</i>	0,84	0,513	0,55	0,255	1,10	0,594	0,87	0,436	1,36	0,501	0,81	0,576	1,02	0,959
<i>Tiam1</i>	0,79	0,117	0,93	0,640	1,08	0,543	1,02	0,912	1,08	0,725	0,55	0,044	0,64	0,165
<i>Erg</i>	0,77	0,335	1,15	0,495	1,15	0,370	0,88	0,571	1,23	0,483	0,96	0,900	1,22	0,681
<i>Wrb</i>	0,76	0,162	1,55	0,057	1,20	0,287	1,47	0,084	0,95	0,884	0,81	0,446	NE	NE
<i>I190017O12Rik</i>	0,74	0,320	1,03	0,900	1,27	0,271	1,24	0,527	0,98	0,961	0,88	0,747	1,46	0,471
<i>Ttc3</i>	0,71	0,539	1,12	0,739	1,19	0,502	1,71	0,196	0,87	0,831	0,80	0,780	0,78	0,799
<i>I700048M11Rik</i>	0,70	0,265	0,87	0,604	1,05	0,832	1,18	0,515	0,99	0,966	0,81	0,570	0,88	0,815
<i>Mrap</i>	0,60	0,363	1,29	0,422	0,90	0,567	0,60	0,157	0,73	0,472	1,01	0,985	0,75	0,584

TABLE 1.3: Ratios d'expression des gènes en 3 copies au cours du développement du cervelet - Partie III. NE : non exprimé. En magenta, les valeurs significatives (ANOVA).

Annexes B

GO ID	Ontologie (processus biologique)	Nb de gènes sur la puce	Nb de gènes significatifs	P-valeur
Immune system				
GO :0006955	immune response	298	5	0,015
Cell cycle				
GO :0048468	cell development	823	56	0,001
GO :0043524	negative regulation of neuron apoptosis	20	5	0,002
GO :0051402	neuron apoptosis	30	6	0,002
GO :0043066	negative regulation of apoptosis	114	11	0,018
GO :0040007	growth	180	14	0,043
GO :0006915	apoptosis	442	29	0,044
Cytoskeleton				
GO :0030029	actin filament-based process	136	14	0,003
GO :0007010	cytoskeleton organization and biogenesis	352	24	0,005
GO :0006996	organelle organization and biogenesis	732	46	0,020
GO :0030036	actin cytoskeleton organization and biogenesis	122	13	0,036
Cell signalling				
GO :0007186	G-protein coupled receptor protein signalling pathway	1222	37	0,008
GO :0007166	cell surface receptor linked signal transduction	1738	62	0,042
Gene regulation				
GO :0006349	imprinting	4	3	0,000
GO :0051028	mRNA transport	32	7	0,000
GO :0006403	RNA localization	35	7	0,001
GO :0015931	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid transport	38	7	0,001
GO :0051236	establishment of RNA localization	34	7	0,001
GO :0006376	mRNA splice site selection	7	3	0,003
GO :0000245	spliceosome assembly	11	3	0,011
GO :0032259	methylation	32	5	0,013
GO :0031497	chromatin assembly	56	6	0,038
GO :0045941	positive regulation of transcription	218	16	0,046
GO :0043414	biopolymer methylation	31	4	0,048
GO :0040029	regulation of gene expression, epigenetic	31	4	0,048
Developmental				

GO :0050877	neurological process	1095	31	0,004
GO :0032501	multicellular organismal process	2833	101	0,005
GO :0051093	negative regulation of developmental process	75	8	0,019
GO :0030326	embryonic limb morphogenesis	50	6	0,023
GO :0048663	neuron fate commitment	16	3	0,032
GO :0048736	appendage development	54	6	0,033
GO :0035264	multicellular organism growth	44	5	0,046
Muscle related				
GO :0007519	striated muscle development	102	11	0,006
GO :0007517	muscle development	135	13	0,009
Sensory perception				
GO :0007608	sensory perception of smell	764	18	0,002
GO :0007600	sensory perception	941	25	0,004
GO :0007606	sensory perception of chemical stimulus	794	20	0,004
GO :0009612	response to mechanical stimulus	15	3	0,027
Other				
GO :0044237	cellular metabolic process	4593	235	0,005
GO :0042403	thyroid hormone metabolic process	9	3	0,006
GO :0006730	one-carbon compound metabolic process	59	7	0,016
GO :0007286	spermatid development	26	4	0,027
GO :0048515	spermatid differentiation	28	4	0,035
GO :0006766	vitamin metabolic process	44	5	0,046

TABLE 2.1: Liste des principaux processus biologiques enrichis et déplétés dans le cervelet chez les souris Ts1Cje à P0. En rouge les catégories enrichies, en vert les catégories déplétées.

GO ID	Ontologie (processus biologique)	Nb de gènes sur la puce	Nb de gènes significatifs	P-valeur
Immune system				
GO :0045621	positive regulation of lymphocyte differentiation	14	4	0,010
GO :0045580	regulation of T cell differentiation	15	4	0,012
GO :0050863	regulation of T cell activation	47	7	0,027
GO :0001776	leukocyte homeostasis	20	4	0,034
GO :0050864	regulation of B cell activation	30	5	0,038
GO :0050778	positive regulation of immune response	72	9	0,046
Cell cycle				
GO :0043281	regulation of caspase activity	35	6	0,021
GO :0048872	homeostasis of number of cells	21	4	0,040
Cell signalling				
GO :0007215	glutamate signaling pathway	8	3	0,011
Gene regulation				
GO :0006397	mRNA processing	160	23	0,000
GO :0008380	RNA splicing	118	21	0,000
GO :0016071	mRNA metabolic process	183	25	0,000
GO :0019219	regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic,,	1417	114	0,006

GO :0045449	regulation of transcription	1392	111	0,009
GO :0009201	ribonucleoside triphosphate biosynthetic process	34	6	0,019
GO :0006486	protein amino acid glycosylation	56	8	0,024
GO :0032259	methylation	32	5	0,049
Developmental				
GO :0048732	gland development	56	9	0,008
GO :0050877	neurological process	1095	50	0,010
GO :0035270	endocrine system development	37	6	0,027
Sensory perception				
GO :0006970	response to osmotic stress	6	3	0,004
GO :0009266	response to temperature stimulus	28	6	0,007
GO :0007606	sensory perception of chemical stimulus	794	34	0,012
GO :0007608	sensory perception of smell	764	33	0,016
GO :0009628	response to abiotic stimulus	118	14	0,021
GO :0009408	response to heat	18	4	0,024
GO :0019233	sensory perception of pain	13	3	0,045
Other				
GO :0009108	coenzyme biosynthetic process	65	12	0,001
GO :0051188	cofactor biosynthetic process	77	13	0,001
GO :0044272	sulfur compound biosynthetic process	17	5	0,003
GO :0019222	regulation of metabolic process	1610	129	0,004
GO :0016051	carbohydrate biosynthetic process	52	9	0,005
GO :0006119	oxidative phosphorylation	36	7	0,007
GO :0044249	cellular biosynthetic process	411	40	0,007
GO :0008152	metabolic process	5115	357	0,008
GO :0031323	regulation of cellular metabolic process	1543	122	0,008
GO :0009058	biosynthetic process	821	69	0,014
GO :0006752	group transfer coenzyme metabolic process	42	7	0,015
GO :0016042	lipid catabolic process	81	11	0,018
GO :0002467	germinal center formation	4	2	0,022
GO :0016192	vesicle-mediated transport	294	28	0,028
GO :0048489	synaptic vesicle transport	19	4	0,029
GO :0043413	biopolymer glycosylation	59	8	0,032
GO :0043283	biopolymer metabolic process	2937	210	0,035
GO :0006732	coenzyme metabolic process	122	14	0,036
GO :0009100	glycoprotein metabolic process	70	9	0,042
GO :0043414	biopolymer methylation	31	5	0,044

TABLE 2.2: Liste des principaux processus biologiques enrichis et déplétés dans le cervelet chez les souris Ts1Cje à P3, En rouge les catégories enrichies, en vert les catégories déplétées.

GO ID	Ontologie (processus biologique)	Nb de gènes sur la puce	Nb de gènes significatifs	P-valeur
Gene regulation				
GO :0006575	amino acid derivative metabolic process	63	5	0,013
GO :0032259	methylation	32	3	0,034
Developmental				
GO :0051240	positive regulation of multicellular organismal process	89	6	0,014

GO :0035264	multicellular organism growth	44	4	0,016
Other				
GO :0006112	energy reserve metabolic process	36	4	0,008
GO :0006119	oxidative phosphorylation	36	4	0,008
GO :0006730	one-carbon compound metabolic process	59	5	0,010
GO :0043412	biopolymer modification	1068	36	0,011
GO :0043283	biopolymer metabolic process	2937	82	0,018
GO :0006464	protein modification process	1032	34	0,019
GO :0044237	cellular metabolic process	4593	119	0,026
GO :0006576	biogenic amine metabolic process	52	4	0,028
GO :0006796	phosphate metabolic process	587	21	0,030
GO :0005977	glycogen metabolic process	31	3	0,031
GO :0006073	glucan metabolic process	31	3	0,031
GO :0043414	biopolymer methylation	31	3	0,031
GO :0043170	macromolecule metabolic process	3990	105	0,033
GO :0043687	post-translational protein modification	887	29	0,042
GO :0051239	regulation of multicellular organismal process	236	10	0,043
GO :0044260	cellular macromolecule metabolic process	2036	58	0,044
GO :0015980	energy derivation by oxidation of organic compounds	62	4	0,049

TABLE 2.3: Liste des principaux processus biologiques enrichis et déplétés dans le cervelet chez les souris Ts1Cje à P7, En rouge les catégories enrichies, en vert les catégories déplétées.

GO ID	Ontologie (processus biologique)	Nb de gènes sur la puce	Nb de gènes significatifs	P-valeur
Immune system				
GO :0002684	positive regulation of immune system process	73	6	0,035
Cell cycle				
GO :0042127	regulation of cell proliferation	236	16	0,009
GO :0008283	cell proliferation	348	20	0,021
Sensory perception				
GO :0007606	sensory perception of chemical stimulus	794	13	0,004
GO :0007608	sensory perception of smell	764	13	0,006
GO :0007600	sensory perception	941	19	0,017
Gene regulation				
GO :0006412	translation	283	18	0,010
GO :0009260	ribonucleotide biosynthetic process	46	5	0,018
GO :0009259	ribonucleotide metabolic process	52	5	0,029
Cell signalling				
GO :0007186	G-protein coupled receptor protein signalling pathway	1222	27	0,017
Developmental				
GO :0051216	cartilage development	32	6	0,001
GO :0016337	cell-cell adhesion	153	12	0,005
GO :0040007	growth	180	13	0,009
GO :0048592	eye morphogenesis	40	5	0,010
GO :0001501	skeletal development	132	10	0,013

GO :0001822	kidney development	59	6	0,014
GO :0035264	multicellular organism growth	44	5	0,015
GO :0001655	urogenital system development	62	6	0,017
GO :0048856	anatomical structure development	1408	62	0,020
GO :0001503	ossification	69	6	0,027
GO :0040008	regulation of growth	107	8	0,027
GO :0031214	biomineral formation	70	6	0,029
GO :0046850	regulation of bone remodeling	21	3	0,031
GO :0048562	embryonic organ morphogenesis	22	3	0,036
GO :0046849	bone remodeling	75	6	0,039
GO :0040014	regulation of body size	39	4	0,040
Other				
GO :0050789	regulation of biological process	2640	108	0,014
GO :0050794	regulation of cellular process	2346	96	0,026
GO :0009059	macromolecule biosynthetic process	437	23	0,029
GO :0009306	protein secretion	21	3	0,031
GO :0006118	electron transport	267	3	0,037
GO :0051345	positive regulation of hydrolase activity	23	3	0,040
GO :0016485	protein processing	60	5	0,049

TABLE 2.4: Liste des principaux processus biologiques enrichis et déplétés dans le cervelet chez les souris Ts1Cje à P10, En rouge les catégories enrichies, en vert les catégories déplétées.

GO ID	Ontologie (processus biologique)	Nb de gènes sur la puce	Nb de gènes significatifs	P-valeur
Cell signalling				
GO :0007186	G-protein coupled receptor protein signaling pathway	1527	6	0,000
GO :0051181	cofactor transport	8	3	0,000
GO :0007166	cell surface receptor linked signal transduction	2127	17	0,000
GO :0007165	signal transduction	3106	41	0,004
GO :0007154	cell communication	3319	47	0,011
Gene regulation				
GO :0016481	negative regulation of transcription	194	9	0,013
GO :0006355	regulation of transcription, DNA-dependent	1514	42	0,016
GO :0032774	RNA biosynthetic process	1537	42	0,017
GO :0045934	negative regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid,,	208	9	0,019
GO :0019219	regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic,,	1604	43	0,024
GO :0007266	Rho protein signal transduction	70	4	0,046
Developmental				
GO :0042063	gliogenesis	33	5	0,000
GO :0050877	neurological process	1398	11	0,000
GO :0010001	glial cell differentiation	30	4	0,002
GO :0007272	ensheathment of neurons	24	3	0,011
GO :0022008	neurogenesis	296	12	0,015
GO :0007399	nervous system development	547	19	0,015

GO :0032501	multicellular organismal process	3404	49	0,015
GO :0030182	neuron differentiation	245	10	0,029
GO :0006357	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	346	12	0,045
Muscle related				
GO :0050881	musculoskeletal movement	31	4	0,003
GO :0050879	multicellular organismal movement	43	4	0,009
Sensory perception				
GO :0050896	response to stimulus	2386	24	0,000
GO :0007600	sensory perception	1213	3	0,000
Other				
GO :0006066	alcohol metabolic process	221	11	0,004
GO :0031323	regulation of cellular metabolic process	1754	49	0,006
GO :0007005	mitochondrion organization and biogenesis	51	4	0,017
GO :0044237	cellular metabolic process	5354	121	0,019
GO :0001508	regulation of action potential	30	3	0,020
GO :0046916	transition metal ion homeostasis	33	3	0,025
GO :0065007	biological regulation	3301	79	0,026
GO :0006730	one-carbon compound metabolic process	60	4	0,028
GO :0031324	negative regulation of cellular metabolic process	246	10	0,029
GO :0030005	di-, tri-valent inorganic cation homeostasis	91	5	0,031
GO :0001525	angiogenesis	124	6	0,033
GO :0048514	blood vessel morphogenesis	161	7	0,036
GO :0040012	regulation of locomotion	65	4	0,037
GO :0006875	metal ion homeostasis	96	5	0,038
GO :0042493	response to drug	39	3	0,039
GO :0030003	cation homeostasis	97	5	0,039
GO :0040014	regulation of body size	41	3	0,044
GO :0042472	inner ear morphogenesis	41	3	0,044
GO :0006873	cell ion homeostasis	100	5	0,044
GO :0050789	regulation of biological process	3043	72	0,047

TABLE 2.5: Liste des principaux processus biologiques enrichis et déplétés dans la couche granulaire externe chez les souris Ts1Cje à P0, En rouge les catégories enrichies, en vert les catégories déplétées.

Bibliographie

- Aguado, C., Colon, J., Ciruela, F., Schlaudraff, F., Cabanero, M. J., Perry, C., Watanabe, M., Liss, B., Wickman, K., and Lujan, R. (2007). Cell type-specific subunit composition of g protein-gated potassium channels in the cerebellum. *J Neurochem.*
- Ahn, K. J., Jeong, H. K., Choi, H. S., Ryoo, S. R., Kim, Y. J., Goo, J. S., Choi, S. Y., Han, J. S., Ha, I., and Song, W. J. (2006). Dyrk1a bac transgenic mice show altered synaptic plasticity with learning and memory defects. *Neurobiol Dis.*, 22(3) :463–72.
- Ait Yahya-Graison, E., Aubert, J., Dauphinot, L., Rivals, I., Prieur, M., Golfier, G., Rossier, J., Personnaz, L., Creau, N., Blehaut, H., Robin, S., Delabar, J. M., and Potier, M. C. (2007). Classification of human chromosome 21 gene-expression variations in Down syndrome : impact on disease phenotypes. *Am J Hum Genet.*, 81(3) :475–91.
- Akeson, E. C., Lambert, J. P., Narayanswami, S., Gardiner, K., Bechtel, L. J., and Davisson, M. T. (2001). Ts65dn – localization of the translocation breakpoint and trisomic gene content in a mouse model for Down syndrome. *Cytogenet Cell Genet.*, 93(3-4) :270–6.
- Aldridge, K., Reeves, R. H., Olson, L. E., and Richtsmeier, J. T. (2007). Differential effects of trisomy on brain shape and volume in related aneuploid mouse models. *Am J Med Genet A.*, 143(10) :1060–70.
- Altafaj, X., Dierssen, M., Baamonde, C., Martí, E., Visa, J., Guimerà, J., Oset, M., González, J. R., Flórez, J., Fillat, C., and Estivill, X. (2001). Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing dyrk1a (minibrain), a murine model of down's syndrome. *Hum Mol Genet.*, 10(18) :1915–23.

- Amano, K., Sago, H., Uchikawa, C., Suzuki, T., Kotliarova, S. E., Nukina, N., Epstein, C. J., and Yamakawa, K. (2004). Dosage-dependent over-expression of genes in the trisomic region of ts1cje mouse model for down syndrome. *Hum Mol Genet.*, 13(13) :1333–40.
- Antonarakis, S. E. and Epstein, C. J. (2006). The challenge of Down syndrome. *Trends Mol Med.*, 12(10) :473–9.
- Antonarakis, S. E., Lyle, R., Dermitzakis, E. T., Reymond, A., and Deutsch, S. (2004). Chromosome 21 and Down syndrome : from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet.*, 5(10) :725–38.
- Armakolas, A. and Klar, A. J. (2007). Left-right dynein motor implicated in selective chromatid segregation in mouse cells. *Science*, 315(5808) :100–1.
- Arron, J. R., Winslow, M. M., Polleri, A., Chang, C. P., Wu, H., Gao, X., Neilson, J. R., Chen, L., Heit, J. J., Kim, S. K., Yamasaki, N., Miyakawa, T., Francke, U., Graef, I. A., and Crabtree, G. R. (2006). Nfat dysregulation by increased dosage of *dscr1* and *dyrk1a* on chromosome 21. *Nature*, 441(7093) :595–600.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., and Sherlock, G. (2000). Gene ontology : tool for the unification of biology. the gene ontology consortium. *Nat Genet.*, 25(1) :25–9.
- Aylward, E. H., Habbak, R., Warren, A. C., Pulsifer, M. B., Barta, P. E., Jerram, M., and Pearlson, G. D. (1997). Cerebellar volume in adults with Down syndrome. *Arch Neurol.*, 54(2) :209–12.
- Baldus, C. D., Liyanarachchi, S., Mrózek, K., Auer, H., Tanner, S. M., Guimond, M., Ruppert, A. S., Mohamed, N., Davuluri, R. V., Caligiuri, M. A., Bloomfield, C. D., and de la Chapelle, A. (2004). Acute myeloid leukemia with complex karyotypes and abnormal chromosome 21 : Amplification discloses overexpression of *app*, *ets2*, and *erg* genes. *PNAS*, 101(11) :3915–20.

- Baxter, L. L., Moran, T. H., Richtsmeier, J. T., Troncoso, J., and H, R. R. (2000). Discovery and genetic localization of Down syndrome cerebellar phenotypes using the ts65dn mouse. *Hum Mol Genet.*, 9(2) :195–202.
- Beisvag, V., Junge, F. K., Bergum, H., Jolsum, L., Lydersen, S., Gunther, C. C., Rammampiaro, H., Langaas, M., Sandvik, A. K., and Laegreid, A. (2006). Genetools—application for functional annotation and statistical hypothesis testing. *BMC Bioinformatics*, 7 :470.
- Belichenko, P. V., Kleschevnikov, A. M., Salehi, A., Epstein, C. J., and Mobley, W. C. (2007). Synaptic and cognitive abnormalities in mouse models of down syndrome : exploring genotype-phenotype relationships. *J Comp Neurol.*, 504(4) :329–45.
- Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate : a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Stat Soc B*, 57 :289–300.
- Berger, C. N. and Epstein, C. J. (1989). Delayed thymocyte maturation in the trisomy 16 mouse fetus. *J Immunol.*, 143(2) :389–96.
- Best, T. K., Siarey, R. J., and Galdzicki, Z. (2007). Ts65dn, a mouse model of Down syndrome, exhibits increased gabab-induced potassium current. *J Neurophysiol.*, 97(1) :892–900.
- Birchler, J. A. (1979). A study of enzyme activities in a dosage series of the long arm of chromosome one in maize. *Genetics.*, 92(4) :1211–1229.
- Birchler, J. A., Riddle, N. C., Auger, D. L., and Veitia, R. A. (2005). Dosage balance in gene regulation : biological implications. *Trends Genet.*, 21(4) :219–26.
- Bush, A. and Beail, N. (2004). Risk factors for dementia in people with Down syndrome : issues in assessment and diagnosis. *Am J Ment Retard.*, 109(2) :83–97.
- Bustin, M., Alfonso, P. J., Pash, J. M., Ward, J. M., Gearhart, J. D., and Reeves, R. H. (1995). Characterization of transgenic mice with an increased content of chromosomal protein hmg-14 in their chromatin. *DNA Cell Biol.*, 14(12) :997–1005.
- Caputo, A. R., Wagner, R. S., Reynolds, D. R., Guo, S. Q., and Goel, A. K. (1989). Down syndrome. clinical review of ocular features. *Clin Pediatr.*, 28(8) :355–8.

- Chakrabarti, L., Galdzicki, Z., and Haydar, T. F. (2007). Defects in embryonic neurogenesis and initial synapse formation in the forebrain of the ts65dn mouse model of Down syndrome. *J Neurosci.*, 27(43) :11483–95.
- Chang, K. T., Shi, Y. J., and Min, K. T. (2003). The drosophila homolog of down's syndrome critical region 1 gene regulates learning : implications for mental retardation. *PNAS*, 100(26) :15794–9.
- Chen, K. G., Szakacs, G., Annereau, J. P., Rouzaud, F., Liang, X. J., Valencia, J. C., Naginei, C. N., Hooks, J. J., Hearing, V. J., and Gottesman, M. M. (2005). Principal expression of two mrna isoforms (abcb 5alpha and abcb 5beta) of the atp-binding cassette transporter gene abcb 5 in melanoma cells and melanocytes. *Pigment Cell Res.*, 18(2) :102–12.
- Chernousov, M. A. and Carey, D. J. (2003). alphavbeta8 integrin is a schwann cell receptor for fibrin. *Exp Cell Res.*, 291(2) :514–24.
- Chrast, R., Scott, H. S., Madani, R., Huber, L., Wolfer, D. P., Prinz, M., Aguzzi, A., Lipp, H. P., and Antonarakis, S. E. (2000). Mice trisomic for a bacterial artificial chromosome with the single-minded 2 gene (sim2) show phenotypes similar to some of those present in the partial trisomy 16 mouse models of down syndrome. *Hum Mol Genet.*, 9(12) :1853–64.
- Contestabile, A., Fila, T., Bartesaghi, R., and Ciani, E. (2008). Cell cycle elongation impairs proliferation of cerebellar granule cell precursors in the ts65dn mouse, an animal model for down syndrome. *Brain Pathol.*
- Contestabile, A., Fila, T., Ceccarelli, C., Bonasoni, P., Bonapace, L., Santini, D., Bartesaghi, R., and Ciani, E. (2007). Cell cycle alteration and decreased cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus and in the neocortical germinal matrix of fetuses with Down syndrome and in ts65dn mice. *Hippocampus*, 17(8) :665–78.
- Costa, A. C., Walsh, K., and T, D. M. (1999). Motor dysfunction in a mouse model for Down syndrome. *Physiol Behav.*, 68(1-2) :211–20.

- Crome, L., Cowie, V., and Slater, E. (1966). A statistical note on cerebellar and brain stem weight in mongolism. *J Ment Defic Res.*, 10 :69–72.
- Dalla Vecchia, L. K., Grosfeld, J. L., West, K. W., Rescorla, F. J., Scherer, L. R., and Engum, S. A. (1998). Intestinal atresia and stenosis : a 25-year experience with 277 cases. *Arch. Surg.*, 133 :490–496.
- Dauphinot, L., Lyle, R., Rivals, I., Dang, M. T., Moldrich, R. X., Golfier, G., Ettwiller, L., Toyama, K., Rossier, J., Personnaz, L., Antonarakis, S. E., Epstein, C. J., Sinet, P. M., and Potier, M. C. (2005). The cerebellar transcriptome during postnatal development of the ts1cje mouse, a segmental trisomy model for Down syndrome. *Hum Mol Genet.*, 14(3) :373–84.
- Davisson, M. T., Schmidt, C., and Akeson, E. C. (1990). Segmental trisomy of murine chromosome 16 : a new model system for studying down syndrome. *Prog Clin Biol Res.*, 360 :263–80.
- Davisson, M. T., Schmidt, C., Reeves, R. H., Irving, N. G., Akeson, E. C., Harris, B. S., and Bronson, R. T. (1993). Segmental trisomy as a mouse model for down syndrome. *Prog Clin Biol Res.*, 384 :117–33.
- Delabar, J. M., Aflalo-Rattenbac, R., and Créau, N. (2006). Developmental defects in trisomy 21 and mouse models. *ScientificWorldJournal.*, 6 :1945–64.
- Delabar, J. M., Theophile, D., Rahmani, Z., Chettouh, Z., Blouin, J. L., Prieur, M., Noel, B., and Sinet, P. M. (1993). Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur J Hum Genet.*, 1(2) :114–24.
- Devlin, R. H., Holm, D. G., and Grigliatti, T. A. (1982). Autosomal dosage compensation drosophila melanogaster strains trisomic for the left arm of chromosome 2. *PNAS*, 79(4) :1200–4.
- Dierssen, M., Vallina, I. F., Baamonde, C., Lumbreras, M. A., Martínez-Cué, C., Calatayud, S. G., and Flórez, J. (1996). Impaired cyclic amp production in the hippocampus of a down syndrome murine model. *Brain Res Dev Brain Res.*, 95(1) :122–4.

- Duprat, F., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Hugnot, J. P., Bigay, J., Lazdunski, M., Romey, G., and Barhanin, J. (1995). Heterologous multimeric assembly is essential for K⁺ channel activity of neuronal and cardiac g-protein-activated inward rectifiers. *Biochem Biophys Res Commun.*, 212(2) :657–63.
- Ema, M., Ikegami, S., Hosoya, T., Mimura, J., Ohtani, H., Nakao, K., Inokuchi, K., Katsuki, M., and Fujii-Kuriyama, Y. (1999). Mild impairment of learning and memory in mice overexpressing the *msim2* gene located on chromosome 16 : an animal model of down's syndrome. *Hum Mol Genet.*, 8(8) :1409–15.
- Epstein, C. J. (2002). 2001 william allan award address. from Down syndrome to the “human” in “human genetics”. *Am J Hum Genet.*, 70(2) :300–13.
- Epstein, C. J., Avraham, K. B., Lovett, M., Smith, S., Elroy-Stein, O., Rotman, G., Bry, C., and Groner, Y. (1987). Transgenic mice with increased cu/zn-superoxide dismutase activity : animal model of dosage effects in Down syndrome. *PNAS*, 84(22) :8044–8.
- Epstein, C. J., Hofmeister, B. G., Yee, D., Smith, S. A., Philip, R., Cox, D. R., and Epstein, L. B. (1985). Stem cell deficiencies and thymic abnormalities in fetal mouse trisomy 16. *J Exp Med.*, 162(2) :695–712.
- Epstein, C. J., McManus, N. H., Epstein, L. B., Branca, A. A., D'Alessandro, S. B., and Baglioni, C. (1982). Direct evidence that the gene product of the human chromosome 21 locus, *ifrc*, is the interferon-alpha receptor. *Biochem Biophys Res Commun.*, 107(3) :1060–6.
- Epstein, L. B. and Epstein, C. J. (1976). Localization fo the gene *avg* for the antiviral expression of immune and classical interferon to the distal portion of the long arm of chromosome 21. *J Infect Dis.*, 133 Suppl :A56–62.
- Epstein, L. B., Lee, S. H., and Epstein, C. J. (1980). Enhanced sensitivity of trisomy 21 monocytes to the maturation-inhibiting effect ot interferon. *Cell Immunol.*, 50(1) :191–4.
- Esquirol, J. E. D. (1838). *Traité des maladies mentales considérées sous le rapport médical, hygiénique et médico-légal.* Baillère, Paris.

- Fabbro, F., Alberti, A., Gagliardi, C., and Borgatti, R. (2002). Differences in native and foreign language repetition tasks between subjects with william's and down's syndromes. *J. Neuroling.*, 15(1) :1–10.
- FitzPatrick, D. R., Ramsay, J., McGill, N. I., Shade, M., Carothers, A. D., and Hastie, N. D. (2002). Transcriptome analysis of human autosomal trisomy. *Hum Mol Genet.*, 11(26) :3249–56.
- Fodor, S. P., Read, J. L., Pirrung, M. C., Stryer, L., Lu, A. T., and Solas, D. (1991). Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science.*, 251(4995) :767–73.
- Freeman, S. B., Taft, L. F., Dooley, K. J., Allran, K., Sherman, S. L., Hassold, T. J., Khoury, M. J., and Saker, D. M. (1998). Population-based study of congenital heart defects in Down syndrome. *Am J Med Genet.*, 80(3) :213–7.
- Gahtan, E., Auerbach, J. M., Groner, Y., and Segal, M. (1998). Reversible impairment of long-term potentiation in transgenic cu/zn-sod mice. *Eur J Neurosci.*, 10(2) :538–44.
- Galdzicki, Z. and Siarey, R. J. (2003). Understanding mental retardation in down's syndrome using trisomy 16 mouse models. *Genes Brain Behav.*, 2(3) :167–78.
- Gardiner, K. and Davisson, M. (2000). The sequence of human chromosome 21 and implications for research into Down syndrome. *Genome Biol.*, 1(2).
- Gardiner, K., Fortna, A., Bechtel, L., and Davisson, M. T. (2003). Mouse models of down syndrome : how useful can they be ? comparison of the gene content of human chromosome 21 with orthologous mouse genomic regions. *Gene.*, 318 :137–47.
- Giannone, S., Strippoli, P., Vitale, L., Casadei, R., Canaider, S., Lenzi, L., D'Addabbo, P., Frabetti, F., Facchin, F., Farina, A., Carinci, P., and Zannotti, M. (2004). Gene expression profile analysis in human t lymphocytes from patients with down syndrome. *Ann Hum Genet.*, 68(6) :546–54.
- Griesel, G., Treichel, D., Collombat, P., Krull, J., Zembrzycki, A., van den Akker, W. M., Gruss, P., Simeone, A., and Mansouri, A. (2006). Sp8 controls the anteroposterior patterning at the midbrain-hindbrain border. *Development*, 133(9) :1779–87.

- Groner, Y. (1995). Transgenic models for chromosome 21 gene dosage effects. *Prog Clin Biol Res.*, 393 :193–212.
- Gropp, A., Giers, D., and Kolbus, U. (1974). Trisomy in the fetal backcross progeny of male and female metacentric heterozygotes of the mouse. *Cytogenet Cell Genet.*, 13(6) :511–35.
- Guidi, S., Bonasoni, P., Ceccarelli, C., Santini, D., Gualtieri, F., Ciani, E., and Bartesaghi, R. (2007). Neurogenesis impairment and increased cell death reduce total neuron number in the hippocampal region of fetuses with Down syndrome. *Brain Pathol.*
- Guo, M., Davis, D., and Birchler, J. A. (1996). Dosage effects on gene expression in a maize ploidy series. *Genetics.*, 142(4) :1349–55.
- Harashima, C., Jacobowitz, D. M., Stoffel, M., Chakrabarti, L., Haydar, T. F., Siarey, R. J., and Galdzicki, Z. (2006). Elevated expression of the g-protein-activated inwardly rectifying potassium channel 2 (*girk2*) in cerebellar unipolar brush cells of a Down syndrome mouse model. *Cell Mol Neurobiol.*, 26(4-6) :719–34.
- Harkins, A. B. and Fox, A. P. (2002). Cell death in weaver mouse cerebellum. *Cerebellum*, 1(3) :201–6.
- Harris, C. D., Ermak, G., and Davies, K. J. (2005). Multiple roles of the *dscr1* (*adapt78* or *rcan1*) gene and its protein product calcipressin 1 (or *rcan1*) in disease. *Cell Mol Life Sci.*, 62(21) :2477–86.
- Harris-Cerruti, C., Kamsler, A., Kaplan, B., Lamb, B., Segal, M., and Groner, Y. (2004). Functional and morphological alterations in compound transgenic mice overexpressing *cu/zn* superoxide dismutase and amyloid precursor protein. *Eur J Neurosci.*, 19(5) :1174–90.
- Hattori, M., mapping, C. ., and sequencing consortium' (2000). The dna sequence of human chromosome 21. *Nature*, 405(6784) :311–9.
- Haydar, T. F., Nowakowski, R. S., Yarowsky, P. J., and Krueger, B. K. (2000). Role of founder cell deficit and delayed neuronogenesis in microencephaly of the trisomy 16 mouse. *J Neurosci.*, 20(11) :4156–64.

- Holtzman, D. M., Santucci, D., Kilbridge, J., Chua-Couzens, J., Fontana, D. J., Daniels, S. E., Johnson, R. M., Chen, K., Sun, Y., Carlson, E., Alleva, E., Epstein, C. J., and Mobley, W. C. (1996). Developmental abnormalities and age-related neurodegeneration in a mouse model of down syndrome. *PNAS*, 93(23) :13333–8.
- Huang, A., Ho, C. S., Ponzielli, R., Barsyte-Lovejoy, D., Bouffet, E., Picard, D., Hawkins, C. E., and Penn, L. Z. (2005). Identification of a novel c-myc protein interactor, jpo2, with transforming activity in medulloblastoma cells. *Cancer Res.*, 65(13) :5607–19.
- Huang, Y., Anderle, P., Bussey, K. J., Barbacioru, C., Shankavaram, U., Dai, Z., Reinhold, W. C., Papp, A., Weinstein, J. N., and Sadee, W. (2004). Membrane transporters and channels : role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Res.*, 64(12) :4294–301.
- Ieshima, A., Kisa, T., Yoshino, K., Takashima, S., and Takaeshita, K. (1984). A morphometric study of down's syndrome showing small posterior fossa and calcification of basal ganglia. *Neuroradiology.*, 26 :493–498.
- Insausti, A. M., Megías, M., Crespo, D., Cruz-Orive, L. M., Dierssen, M., Vallina, I. F., Insausti, R., and Flórez, J. (1998). Hippocampal volume and neuronal number in ts65dn mice : a murine model of down syndrome. *Neurosci Lett.*, 253(3) :175–8.
- Ives, J. H., Dagna-Bricarelli, F., Basso, G., Antonarakis, S. E., Jee, R., Cotter, F., and Nizetic, D. (1998). Increased levels of a chromosome 21-encoded tumour invasion and metastasis factor (tiam1) mrna in bone marrow of down syndrome children during the acute phase of aml(m7). *Genes Chromosomes Cancer.*, 23(1) :61–6.
- Jaarsma, D., Haasdijk, E. D., Grashorn, J. A., Hawkins, R., van Duijn, W., Verspaget, H. W., London, J., and Holstege, J. C. (2000). Human cu/zn superoxide dismutase (sod1) overexpression in mice causes mitochondrial vacuolization, axonal degeneration, and premature motoneuron death and accelerates motoneuron disease in mice expressing a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant sod1. *Neurobiol Dis.*, 6(Pt B) :623–43.

- Kagami, Y. and Furuichi, T. (2001). Investigation of differentially expressed genes during the development of mouse cerebellum. *Brain Res Gene Expr Patterns.*, 1(1) :39–59.
- Kahlem, P., Sultan, M., Herwig, R., Steinfath, M., Balzereit, D., Eppens, B., Saran, N. G., Pletcher, M. T., South, S. T., Stetten, G., Lehrach, H., Reeves, R. H., and Yaspo, M. L. (2004). Transcript level alterations reflect gene dosage effects across multiple tissues in a mouse model of down syndrome. *Genome Res.*, 14(7) :1258–67.
- Kampa, D., Cheng, J., Kapranov, P., Yamanaka, M., Brubaker, S., Cawley, S., Drenkow, J., Piccolboni, A., Bekiranov, S., Helt, G., Tammana, H., and Gingeras, T. R. (2004). Novel rnas identified from an in-depth analysis of the transcriptome of human chromosomes 21 and 22. *Genome Res.*, 14(3) :331–42.
- Kapranov, P., Cawley, S. E., Drenkow, J., Bekiranov, S., Strausberg, R. L., Fodor, S. P., and Gingeras, T. R. (2002). Large-scale transcriptional activity in chromosomes 21 and 22. *Science.*, 296(5569) :916–9.
- Kaufmann, W. E., Cooper, K. L., Mostofsky, S. H., Capone, G. T., Kates, W. R., Newschaffer, C. J., Bukelis, I., Stump, M. H., Jann, A. E., and Lanham, D. C. (2003). Specificity of cerebellar vermian abnormalities in autism : A quantitative magnetic resonance imaging study. *J Child Neurol.*, 18 :463–470.
- Kola, I. and Hertzog, P. J. (1998). Down syndrome and mouse models. *Curr Opin Genet Dev.*, 8(3) :316–21.
- Kola, I. and Pritchard, M. (1999). Animal models of Down syndrome. *Mol Med Today.*, 5(6) :276–7.
- Korenberg, J. R., Chen, X. N., Schipper, R., Sun, Z., Gonsky, R., Gerwehr, S., Carpenter, N., Daumer, C., Dignan, P., and Disteche, C. (1994). Down syndrome phenotypes : the consequences of chromosomal imbalance. *PNAS*, 91(11) :4997–5001.
- Kurt, M. A., Davies, D. C., Kidd, M., Dierssen, M., and Flórez, J. (2000). Synaptic deficit in the temporal cortex of partial trisomy 16 (ts65dn) mice. *Brain Res.*, 858(1) :191–7.
- Kurt, M. A., Kafa, M. I., Dierssen, M., and Davies, D. C. (2004). Deficits of neuronal

- density in ca1 and synaptic density in the dentate gyrus, ca3 and ca1, in a mouse model of down syndrome. *Brain Res.*, 1022(1-2) :101–9.
- Lakhe-Reddy, S., Khan, S., Konieczkowski, M., Jarad, G., Wu, K. L., Reichardt, L. F., Takai, Y., Bruggeman, L. A., Wang, B., Sedor, J. R., and Schelling, J. R. (2006). Beta8 integrin binds rho gdp dissociation inhibitor-1 and activates rac1 to inhibit mesangial cell myofibroblast differentiation. *J Biol Chem.*, 281(28) :19688–99.
- Lamb, B. T., Sisodia, S. S., Lawler, A. M., Slunt, H. H., Kitt, C. A., Kearns, W. G., Pearson, P. L., Price, D. L., and Gearhart, J. D. (1993). Introduction and expression of the 400 kilobase amyloid precursor protein gene in transgenic mice. *Nat Genet.*, 5(1) :22–30.
- Le Brigand, K., Russell, R., Moreilhon, C., Rouillard, J. M., Jost, B., Amiot, F., Magnone, V., Bole-Feysot, C., Rostagno, P., Virolle, V., Defamie, V., Dessen, P., Williams, G., Lyons, P., Rios, G., Mari, B., Gulari, E., Kastner, P., Gidrol, X., Freeman, T. C., and Barbry, P. (2006). An open-access long oligonucleotide microarray resource for analysis of the human and mouse transcriptomes. *Nucleic Acids Res.*, 34(12) :e87.
- Lejeune, J., Gauthier, M., and Turpin, R. (1959a). Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *CR Acad. des Sciences*, 248(11) :1721–2.
- Lejeune, J., Gauthier, M., and Turpin, R. (1959b). Les chromosomes humains en culture de tissus. *CR Acad. des Sciences*, 248(4) :602–3.
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Heurteaux, C., Fosset, M., Romey, G., Barhanin, J., and Lazdunski, M. (1995). Molecular properties of neuronal g-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels. *J Biol Chem.*, 270(48) :28660–7.
- Ligon, K. L., Fancy, S. P., Franklin, R. J., and Rowitch, D. H. (2006). Olig gene function in cns development and disease. *Glia*, 54(1) :1–10.
- Lockstone, H. E., Harris, L. W., Swatton, J. E., Wayland, M. T., Holland, A. J., and Bahn, S. (2007). Gene expression profiling in the adult Down syndrome brain. *Genomics*, 90(6) :647–60.

- Lorenzi, H. A. and Reeves, R. H. (2006). Hippocampal hypocellularity in the ts65dn mouse originates early in development. *Brain Res.*, 1104(1) :153–9.
- Lott, I. T. and Head, E. (2005). Alzheimer disease and Down syndrome : factors in pathogenesis. *Neurobiol Aging.*, 26(3) :383–9.
- Ma'ayan, A., Gardiner, K., and Iyengar, R. (2006). The cognitive phenotype of Down syndrome : insights from intracellular network analysis. *NeuroRx.*, 3(3) :396–406.
- Mao, R., Wang, X., Spitznagel, E. L., Frelin, L. P., Ting, J. C., Ding, H., Kim, J. W., Ruczinski, I., Downey, T. J., and Pevsner, J. (2005). Primary and secondary transcriptional effects in the developing human Down syndrome brain and heart. *Genome Biol.*, 6(13).
- Mao, R., Zielke, C. L., Zielke, H. R., and Pevsner, J. (2003). Global up-regulation of chromosome 21 gene expression in the developing Down syndrome brain. *Genomics.*, 81(5) :457–67.
- Mikhail, F. M., Coignet, L., Hatem, N., Mourad, Z. I., Farawela, H. M., El Kaffash, D. M., Farahat, N., and Nucifora, G. (2004). A novel gene, fga7, is fused to runx1/aml1 in a t(4;21)(q28;q22) in a patient with t-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.*, 39(2) :110–8.
- Moldrich, R. X. (2007). A yeast model of Down syndrome. *Int J Dev Neurosci.*, 25(8) :539–43.
- Moldrich, R. X., Dauphinot, L., Laffaire, J., Rossier, J., and Potier, M. C. (2007). Down syndrome gene dosage imbalance on cerebellum development. *Prog Neurobiol.*, 82(2) :87–94.
- Nakanishi, S. and Okazawa, M. (2006). Membrane potential-regulated ca²⁺ signalling in development and maturation of mammalian cerebellar granule cells. *J Physiol.*, 575(2) :389–95.
- Narod, S. A., Stiller, C., and Lenoir, G. M. (1991). An estimate of the heritable fraction of childhood cancer. *Br J Cancer.*, 63(6) :993–9.

- 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., and Fisher, E. M. (2005). An aneuploid mouse strain carrying human chromosome 21 with down syndrome phenotypes. *Science.*, 309(5743) :2033–7.
- Olson, L. E., Roper, R. J., Baxter, L. L., Carlson, E. J., Epstein, C. J., and Reeves, R. H. (2004). Down syndrome mouse models ts65dn, ts1cje, and ms1cje/ts65dn exhibit variable severity of cerebellar phenotypes. *Dev Dyn.*, 230(3) :581–9.
- Olson, L. E., Roper, R. J., Sengstaken, C. L., Peterson, E. A., Aquino, V., Galdzicki, Z., Siarey, R., Pletnikov, M., Moran, T. H., and Reeves, R. H. (2007). Trisomy for the Down syndrome 'critical region' is necessary but not sufficient for brain phenotypes of trisomic mice. *Hum Mol Genet.*, 16(7) :774–82.
- Ou, X. M., Chen, K., and Shih, J. C. (2006). Monoamine oxidase a and repressor r1 are involved in apoptotic signaling pathway. *PNAS*, 103(29) :10923–8.
- Patil, N., Cox, D., Bhat, D., Faham, M., Myers, R. M., and Peterson, A. S. (1995). A potassium channel mutation in weaver mice implicates membrane excitability in granule cell differentiation. *Nat Genet.*, 11(2) :126–9.
- Peled-Kamar, M., Degani, H., Bendel, P., Margalit, R., and Groner, Y. (1998). Altered brain glucose metabolism in transgenic-pfkl mice with elevated 1-phosphofructokinase : in vivo nmr studies. *Brain Res.*, 810(1-2) :138–45.
- Pennington, B. F., Moon, J., Edgin, J., Stedron, J., and Nadel, L. (2003). The neuropsychology of Down syndrome : evidence for hippocampal dysfunction. *Child Dev.*, 74(1) :75–93.
- Pinter, J. D., Eliez, S., Schmitt, J. E., Capone, G. T., and Reiss, A. L. (2001). Neuroanatomy of Down's syndrome : a high-resolution mri study. *Am J Psychiatry.*, 158(10) :1659–65.
- Potier, M. C., Rivals, I., Mercier, G., Ettwiller, L., Moldrich, R. X., Laffaire, J., Personnaz, L., Rossier, J., and Dauphinot, L. (2006). Transcriptional disruptions in Down syn-

- drome : a case study in the ts1cje mouse cerebellum during post-natal development. *J Neurochem.*, 97(Suppl 1) :104–9.
- Prandini, P., Deutsch, S., Lyle, R., Gagnebin, M., Delucinge Vivier, C., Delorenzi, M., Gehrig, C., Descombes, P., Sherman, S., Dagna Bricarelli, F., Baldo, C., Novelli, A., Dallapiccola, B., and Antonarakis, S. E. (2007). Natural gene-expression variation in down syndrome modulates the outcome of gene-dosage imbalance. *Am J Hum Genet.*, 81(2) :252–63.
- Pritchard, M. A. and Kola, I. (1999). The "gene dosage effect" hypothesis versus the "amplified developmental instability" hypothesis in down syndrome. *J Neural Transm Suppl.*, 57 :293–303.
- Ramos, B., Gaudilliere, B., Bonni, A., and Gill, G. (2007). Transcription factor sp4 regulates dendritic patterning during cerebellar maturation. *PNAS*, 104(23) :9882–7.
- Raz, N., Torres, I. J., Briggs, S. D., Spencer, W. D., Thornton, A. E., Loken, W. J., Gunning, F. M., McQuain, J. D., Driesen, N. R., and Acker, J. D. (1995). Selective neuroanatomic abnormalities in Down's syndrome and their cognitive correlates : evidence from mri morphometry. *Neurology.*, 45(2) :356–66.
- Reeves, R. H., Baxter, L. L., and Richtsmeier, J. T. (2001). Too much of a good thing : mechanisms of gene action in down syndrome. *Trends Genet.*, 17(2) :83–8.
- Reeves, R. H., Irving, N. G., Moran, T. H., Wohn, A., Kitt, C., Sisodia, S. S., Schmidt, C., Bronson, R. T., and Davisson, M. T. (1995). A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat Genet.*, 11(2) :177–84.
- Reeves, R. H., Yao, J., Crowley, M. R., Buck, S., Zhang, X., Yarowsky, P., Gearhart, J. D., and Hilt, D. C. (1994). Astrocytosis and axonal proliferation in the hippocampus of s100b transgenic mice. *PNAS*, 91(12) :5359–63.
- Richtsmeier, J. T., Baxter, L. L., and Reeves, R. H. (2000). Parallels of craniofacial maldevelopment in down syndrome and ts65dn mice. *Dev Dyn.*, 217(2) :137–45.
- Rivals, I., Personnaz, L., Taing, L., and Potier, M. C. (2007). Enrichment or depletion of a go category within a class of genes : which test ? *Bioinformatics*, 23(4) :401–7.

- Roizen, N. J. and Patterson, D. (2003). Down's syndrome. *Lancet.*, 361(9365) :1281–9.
- Roizen, N. J., Wolters, C., Nicol, T., and Blondis, T. A. (1993). Hearing loss in children with Down syndrome. *J Pediatr.*, 123(1) :S9–12.
- Roper, R. J., Baxter, L. L., Saran, N. G., Klinedinst, D. K., Beachy, P. A., and Reeves, R. H. (2006). Defective cerebellar response to mitogenic hedgehog signaling in Down syndrome mice. *PNAS*, 103(5) :1452–6.
- Roubertoux, P. L., Bichler, Z., Pinoteau, W., Seregaza, Z., Fortes, S., Jamon, M., Smith, D. J., Rubin, E., Migliore-Samour, D., and Carlier, M. (2005). Functional analysis of genes implicated in Down syndrome : 2. laterality and corpus callosum size in mice transpolygenic for Down syndrome chromosomal region -1 (*dcr-1*). *Behav Genet.*, 35(3) :333–41.
- Roubertoux, P. L. and Kerdelhué, B. (2006). Trisomy 21 : from chromosomes to mental retardation. *Behav Genet.*, 36(3) :346–54.
- Rueda, N., Mostany, R., Pazos, A., Florez, J., and Martinez-Cue, C. (2005). Cell proliferation is reduced in the dentate gyrus of aged but not young *ts65dn* mice, a model of Down syndrome. *Neurosci Lett.*, 380(1-2) :197–201.
- Ruiz i Altaba, A., Palma, V., and Dahmane, N. (2002). Hedgehog-gli signalling and the growth of the brain. *Nat Rev Neurosci.*, 3(1) :24–33.
- Sago, H., Carlson, E. J., Smith, D. J., Kilbridge, J., Rubin, E. M., Mobley, W. C., Epstein, C. J., and Huang, T. T. (1998). *Ts1cje*, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities. *PNAS*, 95(11) :6256–61.
- Sago, H., Carlson, E. J., Smith, D. J., Rubin, E. M., Crnic, L. S., Huang, T. T., and Epstein, C. J. (2000). Genetic dissection of region associated with behavioral abnormalities in mouse models for Down syndrome. *Pediatr Res.*, 48(5) :606–13.
- Salehi, A., Delcroix, J. D., Belichenko, P. V., Zhan, K., Wu, C., Valletta, J. S., Takimoto-Kimura, R., Kleschevnikov, A. M., Sambamurti, K., Chung, P. P., Xia, W., Villar, A., Campbell, W. A., Kulnane, L. S., Nixon, R. A., Lamb, B. T., Epstein, C. J., Stokin,

- G. B., Goldstein, L. S., and Mobley, W. C. (2006). Increased app expression in a mouse model of down's syndrome disrupts ngf transport and causes cholinergic neuron degeneration. *Neuron*, 51(1) :29–42.
- Salehi, A., Faizi, M., Belichenko, P. V., and Mobley, W. C. (2007). Using mouse models to explore genotype-phenotype relationship in down syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.*, 13(3) :207–14.
- Saran, N. G., Pletcher, M. T., Natale, J. E., Cheng, Y., and Reeves, R. H. (2003). Global disruption of the cerebellar transcriptome in a Down syndrome mouse model. *Hum Mol Genet.*, 12(16) :2013–9.
- Satgé, D., Sasco, A. J., Carlsen, N. L., Stiller, C. A., Rubie, H., Hero, B., de Bernardi, B., de Kraker, J., Coze, C., Kogner, P., Langmark, F., Hakvoort-Cammel, F. G., Beck, D., von der Weid, N., Parkes, S., Hartmann, O., Lippens, R. J., Kamps, W. A., and Sommelet, D. (1998a). A lack of neuroblastoma in down syndrome : a study from 11 european countries. *Cancer Res.*, 58(3) :448–52.
- Satgé, D., Sasco, A. J., Goldgar, D., Vekemans, M., and Réthoré, M. O. (2004). A 23-year-old woman with down syndrome, type 1 neurofibromatosis, and breast carcinoma. *Am J Med Genet A.*, 125A(1) :94–6.
- Satgé, D., Sommelet, D., Geneix, A., Nishi, M., Malet, P., and Vekemans, M. (1998b). A tumor profile in down syndrome. *Am J Med Genet.*, 78(3) :207–16.
- Satge, D., Sasco, A. J., Carlsen, N. L., Rubie, H., and Stiller, C. A. (1997). A negative association between down's syndrome and neuroblastoma. *Arch Dis Child.*, 76(1) :80.
- Schatton, T., Murphy, G. F., Frank, N. Y., Yamaura, K., Waaga-Gasser, A. M., Gasser, M., Zhan, Q., Jordan, S., Duncan, L. M., Weishaupt, C., Fuhlbrigge, R. C., Kupper, T. S., Sayegh, M. H., and Frank, M. H. (2008). Identification of cells initiating human melanomas. *Nature*, 451(7176) :345–9.
- Schmucker, D. (2007). Molecular diversity of dscam : recognition of molecular identity in neuronal wiring. *Nat Rev Neurosci.*, 8(12) :915–20.

- Seguin, E. (1846). *Traitement moral, hygiène et éducation des idiots*. Baillière, Paris.
- Seguin, E. (1866). *Idiocy and its treatment by the physiological method*. William Wood, New York.
- Shapiro, B. L. (1983). Down syndrome—a disruption of homeostasis. *Am J Med Genet.*, 14(2) :241–69.
- Shapiro, B. L. (2001). Developmental instability of the cerebellum and its relevance to down syndrome. *J Neural Transm Suppl.*, 61 :11–34.
- Shumway-Cook, A. and Woollacott, M. H. (1985). Dynamics of postural control in the child with Down syndrome. *Phys Ther.*, 65(9) :1315–22.
- Signorini, S., Liao, Y. J., Duncan, S. A., Jan, L. Y., and Stoffel, M. (1997). Normal cerebellar development but susceptibility to seizures in mice lacking g protein-coupled, inwardly rectifying K⁺ channel *girk2*. *PNAS*, 94(3) :923–7.
- Slesinger, P. A., Patil, N., Liao, Y. J., Jan, Y. N., Jan, L. Y., and Cox, D. R. (1996). Functional effects of the mouse weaver mutation on g protein-gated inwardly rectifying K⁺ channels. *Neuron.*, 16(2) :321–31.
- Solecki, D. J., Liu, X. L., Tomoda, T., Fang, Y., and Hatten, M. E. (2001). Activated notch2 signaling inhibits differentiation of cerebellar granule neuron precursors by maintaining proliferation. *Neuron*, 31(4) :557–68.
- Sotelo, C. (2004). Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. *Prog Neurobiol.*, 72(5) :295–339.
- Sérégaza, Z., Roubertoux, P. L., Jamon, M., and Soumireu-Mourat, B. (2006). Mouse models of cognitive disorders in trisomy 21 : a review. *Behav Genet.*, 36(3) :387–404.
- Sultan, M., Piccini, I., Balzereit, D., Herwig, R., Saran, N. G., Lehrach, H., Reeves, R. H., and Yaspo, M. L. (2007). Gene expression variation in Down’s syndrome mice allows prioritization of candidate genes. *Genome Biol.*, 8(5).
- 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., and Kola, I. (1996). Down's syndrome-like skeletal abnormalities in *ets2* transgenic mice. *Nature*, 379(6565) :534–537.
- Supp, D. M., Brueckner, M., Kuehn, M. R., Witte, D. P., Lowe, L. A., McGrath, J., Corrales, J., and Potter, S. S. (1999). Targeted deletion of the atp binding domain of left-right dynein confirms its role in specifying development of left-right asymmetries. *Development*, 126(23) :5495–504.
- Sussan, T. E., Yang, A., Li, F., Ostrowski, M. C., and Reeves, R. H. (2008). Trisomy represses *apc(min)*-mediated tumours in mouse models of down's syndrome. *Nature*, 451(7174) :73–5.
- Tan, Y. H., Tischfield, J., and Ruddle, F. H. (1973). The linkage of genes for the human interferon-induced antiviral protein and indophenol oxidase-b traits to chromosome g-21. *J Exp Med.*, 137(2) :317–30.
- Thiery, E., Thomas, S., Vacher, S., Delezoide, A. L., Delabar, J. M., and Créau, N. (2003). Chromosome 21 kir channels in brain development. *J Neural Transm Suppl.*, 67 :105–15.
- Tong, Y., Wei, J., Zhang, S., Strong, J. A., Dlouhy, S. R., Hodes, M. E., Ghetti, B., and L, Y. (1996). The weaver mutation changes the ion selectivity of the affected inwardly rectifying potassium channel *girk2*. *FEBS Lett.*, 390(1) :63–8.
- Torres, E. M., Sokolsky, T., Tucker, C. M., Chan, L. Y., Boselli, M., Dunham, M. J., and Amon, A. (2007). Effects of aneuploidy on cellular physiology and cell division in haploid yeast. *Science*, 317(5840) :916–24.
- Travis, M. A., Reizis, B., Melton, A. C., Masteller, E., Tang, Q., Proctor, J. M., Wang, Y., Bernstein, X., X, H., Reichardt, L. F., Bluestone, J. A., and Sheppard, D. (2007). Loss of integrin $\alpha(v)\beta8$ on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature*, 449(7160) :361–5.
- Ugazio, A. G., Maccario, R., Notarangelo, L. D., and Burgio, G. R. (1990). Immunology of Down syndrome : a review. *Am J Med Genet Suppl.*, 7 :204–12.

- Vicari, S. (2004). Memory development and intellectual disabilities. *Acta Paediatr Suppl.*, 93(445) :60–3.
- Vicari, S. (2006). Motor development and neuropsychological patterns in persons with Down syndrome. *Behav Genet.*, 36(3) :355–64.
- Wang, L., Jhee, K. H., Hua, X., DiBello, P. M., Jacobsen, D. W., and Kruger, W. D. (2004). Modulation of cystathionine beta-synthase level regulates total serum homocysteine in mice. *Circ Res.*, 94(10) :318–24.
- Weis, S., Weber, G., Neuhold, A., and Rett, A. (1991). Down syndrome : Mr quantification of brain structures and comparison with normal control subjects. *AJNR AM J Neuroradiol.*, 12 :1207–11.
- White, N., Alkire, M., and Haier, R. (2003). A voxel-based morphometric study of non-demented adults with down syndrome. *Neuroimage.*, 20 :393–403.
- Windham, G. C., Bjerkedal, T., and Langmark, F. (1985). A population-based study of cancer incidence in twins and in children with congenital malformations or low birth weight, norway, 1967-1980. *Am J Epidemiol.*, 121(1) :49–56.
- Wisniewski, K. E. (1990). Down syndrome children often have brain with maturation delay, retardation of growth, and cortical dysgenesis. *Am J Med Genet Suppl.*, 7 :274–81.
- Wolvetang, E. J., Wilson, T. J., Sanij, E., Busciglio, J., Hatzistavrou, T., Seth, A., Hertzog, P. J., and Kola, I. (2003). Ets2 overexpression in transgenic models and in down syndrome predisposes to apoptosis via the p53 pathway. *Hum Mol Genet.*, 12(3) :247–55.
- Zhou, X., Qyang, Y., Kelsoe, J. R., Masliah, E., and Geyer, M. A. (2007). Impaired postnatal development of hippocampal dentate gyrus in sp4 null mutant mice. *Genes Brain Behav.*, 6(3) :269–76.

Publications