



HAL
open science

Correction des déficits cognitifs chez des modèles murins de trisomie 21 par un inhibiteur de la kinase DYRK1A : étude pharmacologique et mécanistique

Thu-Lan Nguyen

► To cite this version:

Thu-Lan Nguyen. Correction des déficits cognitifs chez des modèles murins de trisomie 21 par un inhibiteur de la kinase DYRK1A : étude pharmacologique et mécanistique. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Strasbourg, 2017. Français. NNT : 2017STRAJ124 . tel-01823820

HAL Id: tel-01823820

<https://theses.hal.science/tel-01823820>

Submitted on 26 Jun 2018

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.



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la Vie et de la Santé

UMR 7104 I.G.B.M.C

THÈSE présentée par :

Thu Lan NGUYEN

soutenue le: **21 décembre 2017**

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

Discipline / Spécialité : **Neurosciences**

**Correction des déficits cognitifs chez des modèles murins de trisomie 21 par un inhibiteur de la kinase DYRK1A :
Etude pharmacologique et mécanistique**

THÈSE dirigée par :

Yann HERAULT

Laurent MEIJER

Directeur de Recherche, CNRS, Strasbourg

Directeur de Recherche de Classe Exceptionnelle, CNRS
et Président & Directeur Scientifique de ManRos, Roscoff

RAPPORTEURS

Marc FLAJOLET

Marie-Claude POTIER

Professeur Associé, Université Rockefeller, New York

Directrice de Recherche, CNRS, Paris

EXAMINATEUR

Amélie PITON

Maître de conférences des universités-praticien
hospitalier, HUS Strasbourg

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais exprimer ma profonde reconnaissance envers mes deux co-directeurs de thèse. Tout d'abord merci au Dr. Yann HERAULT de m'avoir donné la chance d'intégrer son équipe et de m'avoir confié ce projet captivant. J'ai ainsi pu réaliser ce travail dans les meilleures conditions possibles. Vous m'avez appris à travailler avec rigueur et à toujours aller plus loin dans mon raisonnement scientifique. J'ai également pu acquérir une autonomie très enrichissante, tout en bénéficiant de vos lumières. Je remercie ensuite le Dr. Laurent MEIJER, qui, malgré la distance, m'a suivi pas-à-pas tout au long de mon parcours. Merci pour tout le savoir que vous m'avez transmis généreusement. Vos précieux conseils m'ont fait grandir tant sur le plan scientifique, que sur le plan humain. Ce fut également une chance d'avoir pu bénéficier grâce à vous, de toutes ces occasions de rencontre avec les grandes personnes du monde de la recherche.

La réussite de ce projet, je la dois donc indéniablement à mes deux co-directeurs. Merci infiniment de m'avoir prise sous vos ailes, de m'avoir soutenue et d'avoir contribué à mon épanouissement scientifique.

Merci à la Fondation Jérôme Lejeune, CIFRE et FUI TRIAD pour leur soutien financier.

Je remercie chaleureusement les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer mon travail de thèse : le Dr. Marc FLAJOLET, le Dr. Marie-Claude POTIER et le Dr. Amélie PITON.

Je souhaiterais ensuite remercier toutes les personnes de l'équipe que j'ai côtoyées au quotidien durant ces trois années. Merci Arnaud DUCHON, d'avoir initié ce fabuleux projet, de m'avoir formé aux tests comportementaux et de m'avoir encadré dans mes débuts au laboratoire. Merci Guillaume PANI pour ta précieuse contribution dans ce projet sans quoi toutes ces expériences n'auraient pu aboutir, mais également d'avoir égayé mes repas du midi. Merci Claire CHEVALIER pour ton expertise sur la gestion de mes petites souris, mais surtout, pour tes conseils sur la « vie ». Je joins également Valérie NALESSO sur ce dernier point. Merci pour votre bonne humeur et vos histoires hilarantes, qui ont été mon oasis pendant mes pauses. Merci Véronique BRAULT et Aline DUBOS pour vos conseils et aides, tous domaines confondus, et d'avoir été d'un soutien réconfortant lorsque cela n'allait pas. Merci Michel ROUX pour ton « œil-expert » et du temps que tu m'as accordé pour éclairer mes

interrogations. Merci Damien MARECHAL pour ta disponibilité, ton humour décalé et tes illuminations lorsque mon esprit scientifique se trouvait dans l'impasse. Merci Maxime SARTORI pour avoir été mon encyclopédie ambulante sur la neuroscience, et pour tes blagues que je n'oserais qualifier. Merci Mar MUNIZ MORENO pour les joies et les fou-rires qu'on a partagé, je regrette qu'on n'ait pas commencé le doctorat en même temps. Merci Mélanie THOMAS d'être passée par là et d'avoir apporté de la gaieté dans mon quotidien. Merci Marion PELLEN de m'avoir inspiré le courage et la persévérance. Enfin, merci à toutes les autres personnes de l'équipe avec qui je n'ai pas eu l'occasion de travailler, mais qui ont participé aux merveilleux souvenirs que je garde de mes années de thèse, je pense à Thomas ARBOGAST, Nassima FERHANI, Monika RATAJ BANIOWSKA et Sandra MARTIN LORENZO.

Un grand merci aux Dr. Spiros GARBIS et Dr. Antigoni MANOUSOPOULOU pour l'étude phosphoprotéomique et pour les très bons moments passés ensemble à Southampton. Merci à Nadia MESSADDEQ, Josiane ERGUEUX et Jean-Luc WEICKERT pour la préparation des échantillons et pour ma formation à la microscopie électronique. Merci aux personnes de la plateforme de phénotypage et notamment Fabrice RIET pour ton aide dans la zone et dans la conception de la nouvelle arène de comportement. Merci à Gabrielle MENGUS et Dominique BIELLMANN de m'avoir formé et sensibilisé aux risques à la manipulation des produits radioactifs. Merci à Cindy VINCENT et Cyrille WIECROCK d'avoir pris soin de mes souris à la zone d'élevage ICS, et d'avoir répondu à toutes mes requêtes, même les plus capricieuses. Merci à Gilles DUVAL et Dzemailj MEMEDOV alias Djemo, d'avoir pris soin de mes souris à la zone conventionnelle IGBMC, mais aussi pour votre sourire et votre gentillesse.

Je remercie mon frère et ma belle-sœur ainsi que toute Ze Big Family de m'avoir soutenue et encouragée jusqu'au bout. Merci à mon père, et à ma mère qui a été ma plus grande force durant ces trois années. Vous avez sacrifié tellement pour que je puisse en arriver là aujourd'hui. Merci de m'avoir inculqué le sens du travail et la valeur du mérite. Merci à MaNana pour tes petites attentions qui m'ont mainte fois réchauffé le cœur mais aussi pour ta grande écoute, ton soutien et tes conseils. Merci à Monsieur Sou d'être entré dans ma vie, de m'avoir épaulé et d'avoir été mon bol d'air frais.

Je profite de ces quelques dernières lignes pour enfin adresser toute ma gratitude à mon mentor, une de mes plus belles rencontres. Votre sagesse et votre bienveillance ont été un cadeau, merci du fond du cœur.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	1
LISTE DES FIGURES ET TABLES	7
RESUME	10
1. INTRODUCTION	13
1.1. La trisomie 21 ou Syndrome de Down : la première anomalie chromosomique décrite chez l'homme	15
1.2. Epidémiologie et génétique de la trisomie 21	16
1.3. Caractéristiques phénotypiques associées au Syndrome de Down.....	18
1.3.1. Dysmorphies physiques	18
1.3.2. Pathologies associées au Syndrome de Down	19
1.3.3. Dysfonctions cognitives.....	22
1.3.4. Anomalies cérébro- et neuro-structurales	25
1.4. Le chromosome 21 et la région chromosomique du syndrome de Down (DCR)	26
1.5. Les modèles murins du Syndrome de Down	28
1.6. Phénotypes sensibles au dosage des gènes : lumière sur DYRK1A.....	31
1.7. DYRK1A	32
1.7.1. Le gène.....	32
1.7.2. La protéine	33
1.8. Altérations des fonctions mnésiques associées au surdosage de DYRK1A.....	39
1.9. DYRK1A, cible potentielle pour le traitement thérapeutique améliorant les performances cognitives des individus porteurs de la trisomie 21.....	42
1.10. Les inhibiteurs pharmacologiques de DYRK1A	43
1.10.1. Les inhibiteurs de DYRK1A synthétiques	43
1.10.2. Les inhibiteurs de DYRK1A de source naturelle et dérivés	44
1.10.3. Tous inhibiteurs de DYRK1A mais... ..	47
1.11. Le projet	49
2. MATERIELS ET METHODES	51
2.1. Les animaux.....	53
2.1.1. Hébergement	53
2.1.2. Génotypage des animaux	53
2.1.2.1. Digestion tissulaire et extraction d'ADN	53
2.1.2.2. Amplification du fragment d'ADN d'intérêt par PCR.....	53

2.1.2.3.	Electrophorèse sur gel d'agarose et révélation aux UV	54
2.2.	Traitement aux Leucettines	55
2.3.	Tests de comportement: l'OPR (« Object Place Recognition ») et le NOR (« Novel Object Recognition »)	55
2.3.1.	Phase d'habituation à l'expérimentateur.....	55
2.3.2.	Matériels	55
2.3.3.	La reconnaissance de nouvel objet ou Novel Object Recognition (NOR)	56
2.3.4.	La reconnaissance du nouvel emplacement de l'objet ou Object Place Recognition (OPR).....	57
2.3.5.	Traitement des données et analyses statistiques	57
2.4.	Pharmacocinétique et biodistribution de la L41 : préparation des échantillons	57
2.5.	Etude phosphoprotéomique : l'analyse des données	58
2.6.	Fractionnement subcellulaire.....	58
2.6.1.	Isolation de la fraction nucléaire.....	58
2.6.2.	Isolation de la fraction synaptosomale.....	59
2.6.3.	Confirmation de la purification des fractions par western blot et quantification de l'expression de DYRK1A.	60
2.7.	Co-immunoprécipitation.....	61
2.7.1.	Extraction des protéines	61
2.7.2.	Co-immunoprécipitation des protéines d'intérêt	61
2.7.3.	Mise en évidence par western blot.....	61
2.8.	Mesure de l'activité kinase	62
2.8.1.	Immunoprécipitation des kinases.....	62
2.8.2.	Mesure d'activité kinase par radioactivité	62
2.9.	Comptage vésiculaire en microscopie électronique à transmission	63
2.9.1.	Préparation des échantillons	63
2.9.2.	Prise d'images et quantification.....	64
3.	RESULTATS	65
A.	Mode d'action de la L41	68
3.1.	Pharmacocinétique et biodistribution de la L41 suite à une injection intra-péritonéale	68
3.2.	Effet de différentes Leucettines dans les tests de l'OPR et du NOR dans plusieurs modèles murins de la T21	70
3.2.1.	Effet de la L41 dans le test de l'OPR chez les mâles et femelles Tg(<i>Dyrk1a</i>).....	70
3.2.2.	Effet de la L41 dans le test du NOR chez les mâles et femelles Tg(<i>Dyrk1a</i>).....	72
3.2.3.	Effet de la L41 dans le test du NOR chez un premier modèle plus complexe de T21 : les Ts65Dn	73

3.2.4.	Effet de la L41 dans le test du NOR chez un second modèle plus complexe de T21 : les Dp1yey	74
3.2.5.	Effet de la L71 et de la L3, deux dérivés de la L41 dans le test du NOR chez les Tg(<i>Dyrk1a</i>).....	75
3.3.	Effet de durées de traitement plus courtes, dans le test du NOR chez les Tg(<i>Dyrk1a</i>)	76
3.3.1.	Effet de la L41 après 5 jours de traitement dans le test du NOR chez les souris Tg(<i>Dyrk1a</i>).....	76
3.3.2.	Effet de la L41 après 12 jours de traitement dans le test du NOR chez les souris Tg(<i>Dyrk1a</i>).....	77
3.4.	Rémanence de l'effet de la L41 sur l'activité kinase de DYRK1A et dans le test du NOR après l'arrêt d'un traitement de 19 jours	78
3.4.1.	Effet de la L41 sur l'activité kinase de DYRK1A et dans le test du NOR 24h après l'arrêt du traitement de 19 jours	79
3.4.2.	Effet de la L41 sur l'activité kinase de DYRK1A 48h après l'arrêt de traitement de 19 jours.....	80
3.5.	Dose/réponse de la L41 dans l'activité kinase de DYRK1A des souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) et contrôles	81
3.6.	Expression de DYRK1A et dosage de la L41 subcellulaire	83
3.6.1.	Expression subcellulaire de DYRK1A dans les souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) et contrôles ..	83
3.6.2.	Dosage subcellulaire de la L41 dans les cerveaux de souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) et contrôles	85
B.	Mécanismes biologiques sous-jacents aux déficits mnésiques observés dans les modèles murins de la T21 et restaurés par la L41	87
3.7.	Modification du phosphoprotéome par le surdosage de DYRK1A.....	88
3.8.	Le complexe SYNAPSINE 1 et DYRK1A	94
3.9.	Conséquences de l'interaction de DYRK1A/SYN-1 in vivo et effet de la L41.....	97
3.10.	Autres partenaires de DYRK1A révélés par l'analyse du phosphoprotéome.....	99
3.10.1.	DYRK1A et KIF2A	99
3.10.2.	DYRK1A et NR2B.....	101
4.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	109
	Mode d'action de la L41	111
	Mécanismes biologiques sous-jacents aux déficits mnésiques observés dans les modèles murins de la T21	119
5.	CONCLUSION GENERALE	135
6.	ANNEXES	139
7.	BIBLIOGRAPHIE	155

LISTE DES ABREVIATIONS

°C	Degrés celsius
µl	Microlitre
µM	Micromolaire
aa	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPA	alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid
AP4	Activator Protein 4
APP	Amyloid Precursor Protein
Arg	Arginine
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ASF	Alternative Splicing Factor
ATP	Adenosin trisphosphate
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BET	Bromure d'éthidium
Caln	Calcineurin
CAMK2A	Calcium/calmodulin dependent protein kinase II alpha
CAMKv	CaM Kinase-like Vesicle Associated
CB1	Cannabinoïde type 1
CBR1	Carbonyl reductase [NADPH] 1
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CLK	Cdc2-Like Kinase
CLK1	CDC-like kinase
cm	Centrimètre
COX2	Cyclooxygenase 2
C-ter	Extrémité C-terminale
CycD1	Cyclin-D1

DCR	Région chromosomique du syndrome de Down
DG	Gyrus denté
DH	DYRK Homology-box
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
dNTP	Deoxynucleotide
Do	Objet déplacé
DSCAM	Down Syndrome Cell Adhesion Molecule
dSTORM	Direct stochastic optical reconstruction microscopy
DTT	Dithiothréitol
DYRK	Dual Specificity Tyrosine Phosphorylation Regulated Kinase
EC	Cortex entorhinal
EDTA	Ethylene-diamine-tetraacetic acid
EGCG	Epigallocatechine gallate
EGTA	Ethylene-bis(oxyethylenitrilo)tetraacetic acid
ERG	Transcriptional regulator ERG
FINDY	Folding Intermediate-selective inhibitor of DYRK1A
FKHR	Forkhead in rhabdomyosarcoma
FKHR	Forkhead transcription factor
Fo	Objet familial
g	Gramme
GABA	Gamma aminobutyric acid
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GluN2A	Glutamate Receptor ionotropic NMDA 2A
GLUR1	Glutamate Receptor 1
GPCR	G protein-coupled receptor
GSK	Glycogen Synthase Kinase
h	Heure
H2B	Histone 2B
HEK293	Human Embryonic Kidney cells 293
HSA21	<i>Homo Sapiens</i> autosome 21

i.p.	Intrapéritonéal
IGBMC	Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
INDY	Inhibitor of DYRK1A
IP	Immunoprécipitation
IRM	Imagerie par résonance magnétique
KCNJ6	G protein-activated inward rectifier potassium channel 2
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramme
KIF2A	Kinesin-like protein
L41, L71, L3	Leucettine #41, #71, #3
LTP	Long Term Potentiation
M	Molaire
MAO-A	Monoamine oxydase A
MAP	Mitogen-Activated Protein
MAP1B	Microtubule Associated Protein 1B
MAP4K4	Mitogen-activated 4 kinase 4
Mb	Méga-base
mg	Milligramme
min	Minute
mM	Millimolaire
Mmu	Mouse chromosome
MNB	Minibrain
MPP	1-méthyl-4-phenylpyridinium
MPTP	1-méthyl-4-phenyl 1,2,3,4-tetrahydropyridine
MRD7	Mental Retardation autosomal Disease 7
NaF	Sodium Fluoride
NFAT	Nuclear Factor Activated T cells
NLS	Nuclear Localization Signal
nm	Nanomètre
No	Objet nouveau

NOR	Novel Object Recognition
NRSE	Neuron-Restrictive Silencer Element
NT	Non traité
OPR	Object Place Recognition
PAK1	p21-Activated kinase 1
Pb	Paire de bases
PCLO	Piccolo
PCR	Polymerase Chain reaction
PEG	Polyethylene glycol
PEST	Proline-gluamate-serine-threonine-rich
PFA	Paraformaldéhyde
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
Pro	Proline
PS1	Presenelin 1
PSD95	Post Synapse Density 95
QI	Quotient intellectuel
RCAN1	Regulator of calcineurin 1
rcf	Rotational centrifugal force
Rec	Recombinant
REST	RE1 Silencing Transcription
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
ROCK	Rho-associated protein kinase
Rpm	Rotations par minute
s	Seconde
S ou Ser	Sérine
SAP155	SIT4-Associating Protein 155
SD	Syndrome de Down
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SF3b1	Splicing Factor 3B subunit 1
ShRNA	Short hairpin RNA

SIRT1	NAD-dependent deacetylase sirtuin-1
SPRED	Sprouty-related Protein with an EVH1 domain
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
SV	Vésicule Synaptique
SYN-1	Synapsin-1
SYNGAP	Ras/Rap GTPase-activating protein
T	Traité
T ou Thr	Thréonine
T21	Trisomie 21
Tg	Transgénique
TTC3	E3 ubiquitin-protein ligase
Tyr	Tyrosine
UiFC	Ubiquitination-induced fluorescence complementation
V	Volt
WDR68	WD Repeat-containing protein 68
wt	wild-type
YAC	Yeast Artificial Chromosome

LISTE DES FIGURES ET TABLES

FIGURES

Figure 1a. Caryotype d'un homme atteint d'une trisomie 21 libre.....	17
Figure 1b. Schéma d'un caryotype humain porteur d'une trisomie 21 par translocation robertsonienne.	17
Figure 2. Dysmorphies physiques d'un enfant atteint de la T21.....	19
Figure 3. Schéma de la mémoire de travail.....	23
Figure 4. Représentation de la DCR-1 sur le chromosome 21 comprise dans l'encadré grisé.....	27
Figure 5. Répartition synténique des gènes murins orthologues aux gènes du chromosome Hsa21 sur les chromosomes Mmu10, Mmu16 et Mmu17	28
Figure 6. Quelques modèles murins de trisomie 21 partielle : Dp1Yey, Ts65Dn et Ts1Cje..	31
Figure 7. Arbre phylogénétique des classes de kinases CMGC avec un zoom sur la famille des kinases DYRKs.....	33
Figure 8. Schéma de la structure des 5 protéines DYRKs.....	34
Figure 9. Expression tissulaire de DYRK1A.....	35
Figure 10. Concentration de la L41 dans le plasma et dans le cerveau des animaux sauvages (wt) et Tg(<i>Dyrk1a</i>).....	69
Figure 11. Effet de la L41 sur la mémoire spatiale des souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) mesurée dans le test de l'OPR.....	71
Figure 12. Effet de la L41 sur la mémoire de reconnaissance des animaux Tg(<i>Dyrk1a</i>) mesurée dans le test du NOR.....	72
Figure 13. Effet de la L41 sur la mémoire de reconnaissance des souris Ts65Dn dans le test du NOR.....	73
Figure 14. Effet de la L41 sur la mémoire de reconnaissance des souris Dp1yey mesurée dans le test du NOR.....	74
Figure 15. Effet de la L3 et de la L71 sur la mémoire de reconnaissance des souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) dans le test du NOR.....	76
Figure 16. Effet de la L41 sur la mémoire de reconnaissance des animaux Tg(<i>Dyrk1a</i>) après 5 jours de traitement.....	77
Figure 17. Effet de la L41 sur la mémoire de reconnaissance des souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) après 12 jours d'administration.....	78
Figure 18. Activité kinase de DYRK1A dans les extraits de cerveau de souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) et contrôles, traitées ou non à la L41, 24h après l'arrêt d'un traitement de 19 jours.....	79
Figure 19. Effet de la L41 sur la correction mnésique des Tg(<i>Dyrk1a</i>) 24h après l'arrêt d'un traitement de 19 jours.....	80

Figure 20. Activité kinase de DYRK1A dans les extraits de cerveau de souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) et contrôles, traitées ou non à la L41, 48h après l'arrêt d'un traitement de 19 jours.	81
Figure 21. Dosage de l'activité kinase de DYRK1A (%) dans des extraits de cerveaux de souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) et contrôles traitées ou non avec deux doses différentes en L41.	82
Figure 22. Expression subcellulaire de la protéine kinase DYRK1A dans les souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) et contrôles.	84
Figure 23. Dosage de la L41 (nM) dans le noyau et cytoplasme des souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) et sauvages traitées ou non par la L41 (20 mg/kg) pendant 19 jours.	85
Figure 24. Phosphoprotéines dérégulées par l'excès de DYRK1A et modulées en sens inverse par la L41, pour chaque région du cerveau des souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) et Ts65Dn.	89
Figure 25. Analyse des fonctions biologiques enrichies dans ToppCluster.	91
Figure 26. Comparaison des phosphoprotéines communes aux trois régions du cerveau de chaque modèle.	92
Figure 27. Sites de phosphorylation des protéines MAP1A, MAP1B, MAP2, PICCOLO et SYNAPSIN-1, modulés par la trisomie des Tg(<i>Dyrk1a</i>) et Ts65Dn et sensibles au traitement par la L41.	93
Figure 28. Mise en évidence par western blot des protéines DYRK1A (85 kDa), SYN-1 (74 kDa), CAMK2 (50 kDa) et GAPDH (37 kDa) dans les fractions d'homogénat et d'immunoprecipitation (IP) de DYRK1A et SYN-1.	95
Figure 29. Mesure de l'activité kinase (%) d'une protéine recombinante DYRK1A vis-à-vis de différents peptides SYN-1, SYN-1-S551A et SYN-1-S553A.	96
Figure 30. Les trois régions de l'hippocampe sélectionnées (aires rayées) pour l'analyse ultra-structurale des synapses des souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) traitées ou non à la L41 et leurs contrôles correspondants.	97
Figure 31. Quantification des vésicules présynaptiques dans les régions hippocampiques du CA3, CA1 et DG (gyrus denté) des souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) traitées ou non à la L41 et leurs contrôles correspondants.	98
Figure 32. Détection par western blot des protéines DYRK1A (85 kDa), KIF2A (110 kDa), et GAPDH (37 kDa) dans les fractions d'homogénat et d'immunoprecipitation (IP) de DYRK1A et KIF2A.	99
Figure 33. Mesure de l'activité kinase (%) d'une protéine recombinante DYRK1A en vis-à-vis du peptide contrôle Woodtide ou d'intérêt KIF2A-tide.	100
Figure 34. Détection par western blot des protéines DYRK1A (85 kDa), NR2B (180 kDa), et GAPDH (37 kDa) dans les fractions d'homogénat et d'immunoprecipitation (IP) de DYRK1A et NR2B.	102
Figure 35. Schéma du transport intracellulaire de la sous-unité NR2B.	103
Figure 36. Détection par western blot des protéines DYRK1A (85 kDa), KIF17 (120 kDa), et GAPDH (37 kDa) dans les fractions d'homogénat et d'immunoprecipitation (IP) de DYRK1A.	104
Figure 37. Schéma des récepteurs membranaires AMPA, NMDA et mGlu complexés avec les protéines de la PSD.	105

Figure 38. Détection par western blot des protéines DYRK1A (85 kDa), PSD95 (95 kDa), CAMK2 (50 kDa), GLUR1 (106 KDa) et GAPDH (37 kDa) dans les fractions d'homogénat et d'immunoprecipitation (IP) correspondante de DYRK1A, PSD95 et SYNGAP.	106
Figure 39. Mesure de l'activité kinase (%) d'une protéine recombinante DYRK1A en vis-à-vis du peptide contrôle Woodtide ou d'intérêt NR2B-tide.	107
Figure 40. Comparaison des sites phosphorylés dans Piccolo et Synapsin-1 dans notre analyse phosphoprotéomique avec ceux de l'étude de Kohansal-Nodehi et al., 2016.....	121
Figure 41. Sites de phosphorylation connus de la SYN-1 chez le rat.	123
Figure 42. Schéma des connectivités cortico-hippocampiques.....	125
Figure 43. Représentation des différentes couches des structures du CA3 et CA1 hippocampiques.....	126
Figure 44. Structures (a.) d'un neurone granulaire du gyrus denté, (b.) d'un neurone étoilé du cortex entorhinal et (c.) de neurones pyramidaux de la couche II et III du cortex entorhinal et des régions CA3 et CA1 hippocampiques.....	127
Figure 45. Trois hypothèses de mécanismes de compensation de l'altération du pool de réserve par la L41.	131
Figure 46. Sites de phosphorylation du domaine C-terminal de la sous-unité NR2B par les kinases PKC et SRC.	134

TABLES

Table 1. Tableau récapitulatif de l'analyse phosphoprotéomique.....	91
Table 2. Analyse des processus biologiques enrichis selon l'analyse DAVID.	93
Table 3. Séquence des peptides utilisés dans les essais kinases.....	98
Table 4. Séquence peptidique de NR2B hyperphosphorylé sur le résidu d'intérêt (en bleu) par la trisomie et sous-phosphorylé suite au traitement par la L41, dans l'hippocampe des souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) et Ts65Dn.	104

RESUME

La Trisomie 21 (T21) est due à la présence d'une copie supplémentaire du chromosome 21. C'est le retard mental le plus fréquent qui touche environ un nouveau-né sur 700. On estime qu'environ 6 millions de personnes sont actuellement porteuses de T21 dans le monde, dont 50 000 en France. Les principales caractéristiques d'un patient atteint de T21 incluent une dysmorphie cranio-faciale, une hypotonie musculaire, ainsi qu'une déficience intellectuelle. Ce dernier trait phénotypique est sans aucun doute un des plus handicapants pour la vie quotidienne des patients. En effet, dans les cas les plus sévères, leur capacité à se faire comprendre et à communiquer de manière orale et écrite, est très faible. La déficience intellectuelle qui les touche peut considérablement impacter leur autonomie dans les tâches quotidiennes telles que se nourrir, se vêtir, faire sa toilette. Cela peut également rendre difficile leur compréhension de la notion de temps et d'argent, ou encore altérer leur conscience face au danger.

Il apparaît donc clairement qu'augmenter le quotient intellectuel des individus atteints de T21, leur permettrait d'acquérir plus d'indépendance, une meilleure intégration sociale et ainsi, une qualité de vie supérieure pour eux-mêmes et leur famille.

Parmi les gènes candidats impliqués dans les déficiences intellectuelles de la Trisomie 21, *DYRK1A* (« Dual Specificity Tyrosine Phosphorylation Regulated Kinase ») est un des plus pertinents. En effet, ce gène qui code pour une kinase, est inclus dans la région critique du chromosome 21 dont les gènes sont connus pour être responsables de la majorité des phénotypes observés dans la T21. De plus, plusieurs études ont démontré une corrélation entre l'augmentation de l'activité de cette kinase et les déficits cognitifs mesurés dans les modèles murins de la T21. De manière intéressante, un traitement avec un inhibiteur de *DYRK1A*, l'EGCG, a permis de corriger avec succès des défauts cognitifs chez la souris et l'humain. Cependant, ce polyphénol issu du thé vert n'agit pas seulement comme un inhibiteur de *DYRK1A*, il possède bien d'autres cibles. Parmi elles se trouvent les récepteurs à la laminine ou encore la Vimentine, sensibles à l'EGCG à des doses encore plus faibles que *DYRK1A*, mais aussi les récepteurs aux cannabinoïdes CB1. Une interaction anormale avec ces récepteurs entraîne des troubles de l'humeur, qui, dans les cas les plus graves, ont conduit au suicide comme cela a été le cas avec le Rimonabant, un agoniste des CB1 maintenant retiré du marché. Néanmoins, ces résultats ont clairement démontré l'implication de *DYRK1A* dans les déficiences intellectuelles et l'effet bénéfique de son inhibition sur les capacités cognitives.

Dans cette thèse, nous avons caractérisé des inhibiteurs plus sélectifs de DYRK1A (Leucettines), synthétisés et optimisés par la start-up de biotechnologie ManRos Therapeutics, dans différents modèles trisomiques murins exprimant une copie surnuméraire de *Dyrk1a* (Tg(*Dyrk1a*)), ou possédant en plus d'autres gènes homologues au chromosome 21 humain (Ts65Dn, Dp(16)1Yey). Nos résultats ont permis (1) d'établir la preuve de concept que l'inhibition pharmacologique de DYRK1A compense les déficits mnésiques liés à la T21 et également (2) de découvrir de nouvelles cibles, directes ou indirectes, de DYRK1A et, par conséquent, de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux altérations mnésiques liées au surdosage de DYRK1A.

1. INTRODUCTION

1.1. La trisomie 21 ou Syndrome de Down : la première anomalie chromosomique décrite chez l'homme

Des caractéristiques évoquant la trisomie 21 (abrégée T21) ont été mentionnées pour la première fois par le médecin français Jean-Etienne-Dominique Esquirol dans son ouvrage de 1838 (Esquirol, 1838). Mais c'est au Dr. Edouard Seguin qu'a été attribuée la première description complète des traits cliniques de la T21. D'abord dans son ouvrage de 1848 où il détaille les phénotypes observés chez deux enfants porteurs potentiels de la trisomie 21, Cécile et Paul. Puis dans son second ouvrage de 1866 où il ne fait pas d'étude de cas individuel mais propose plutôt des « méthodes » thérapeutiques ou d'« éducation physiologique ». C'est d'ailleurs dans cet ouvrage que Seguin a introduit le terme de « crétinisme furfuracé » pour désigner la pathologie. Dans la même année, le médecin anglais John Langdon Down publie un article intitulé « Observations on an ethnic classification of idiots » dans lequel il classe « les idiots » selon leur traits ethniques et physiques et dans lequel il décrit de manière précise la maladie qu'il nomme « mongolisme ». C'est en 1959 que la cause génétique de ce syndrome, à savoir la présence surnuméraire d'un chromosome encore non identifié, a été mise en évidence par Jérôme Lejeune, Marthe Gautier et Raymond Turpin (Lejeune et al., 1959). Ce n'est que deux ans plus tard que ce chromosome supplémentaire a été identifié par la même équipe comme le chromosome 21, et que l'appellation « idiotie mongoloïde » a alors été remplacée par Syndrome de Down (abrégé SD), terme adopté ensuite de manière officielle par l'Organisation Mondiale de la Santé en 1965.



Edouard Seguin



John Langdon Down



Jérôme Lejeune

1.2. Epidémiologie et génétique de la trisomie 21

La trisomie 21 représente l'aberration chromosomique la plus fréquente dans le monde. Sa fréquence est classiquement de 1/700 naissances. Bien que ce chiffre apparaisse dans la majorité des publications, il ne reflète que partiellement la réalité puisqu'il varie souvent d'un pays à un autre en fonction du statut socio-économique, des pratiques religieuses, de l'accès au diagnostic anténatal ou encore des lois régissant la possibilité d'interruption médicale de grossesse. Par exemple à Dubaï, la fréquence est plus élevée et atteint 1/454 naissances (Murthy et al., 2007). Aux Etats-Unis, elle a été de 1/850 entre 1999 et 2006 selon des données issues d'une large étude de onze systèmes de surveillance de naissances américaines (Canfield et al., 2006; Parker et al., 2010). En France, la fréquence de 1 cas sur 1500 à 2000 naissances est plutôt stable comme l'a montré une étude conduite par le Dr. Vigan et collaborateurs en 2007 sur une population parisienne entre 2001 et 2005. Cependant, il est à noter que ce chiffre a subi une baisse d'un facteur 3 depuis 1978 (Rousseau et al., 2010) du fait de l'augmentation de l'âge de la primiparité qui est passé en moyenne de 26 ans à 30 ans entre les années 1978 et 2005. En effet, le risque qu'un fœtus soit porteur de la T21 croît en fonction de l'âge de la mère. Ainsi, il est de 1/1500 à 20 ans, 1/1000 à 30 ans et 1/100 à 40 ans (Mai et al., 2013).

D'un point de vue génétique, la trisomie 21 se décline sous trois formes : tout d'abord la trisomie 21 complète, libre et homogène qui signifie que le porteur possède un chromosome 21 entier surnuméraire, que les trois copies sont bien séparées les unes des autres et sont présentes dans toutes les cellules de l'organisme (**Figure 1a**). C'est le cas de figure le plus courant qui touche 93% des patients. Puis il y a la trisomie par translocation robertsonienne dans laquelle la troisième copie du chromosome 21 fusionne avec un autre chromosome, le plus souvent le 14 (**Figure 1b**). L'individu atteint de cette trisomie portera donc bien 23 paires de chromosome mais exprimera trois doses des gènes du chromosome 21. Environ 5% des cas sont touchés par cette forme. Enfin, dans 2% des cas, la trisomie est libre et mosaïque. C'est-à-dire qu'une population de cellules possède le bon nombre de chromosome tandis que l'autre population exprime en plus une troisième copie du chromosome 21.



Figure 1a. Caryotype d'un homme atteint d'une trisomie 21 libre. Image issue du Wisconsin State Laboratory of Hygiene.

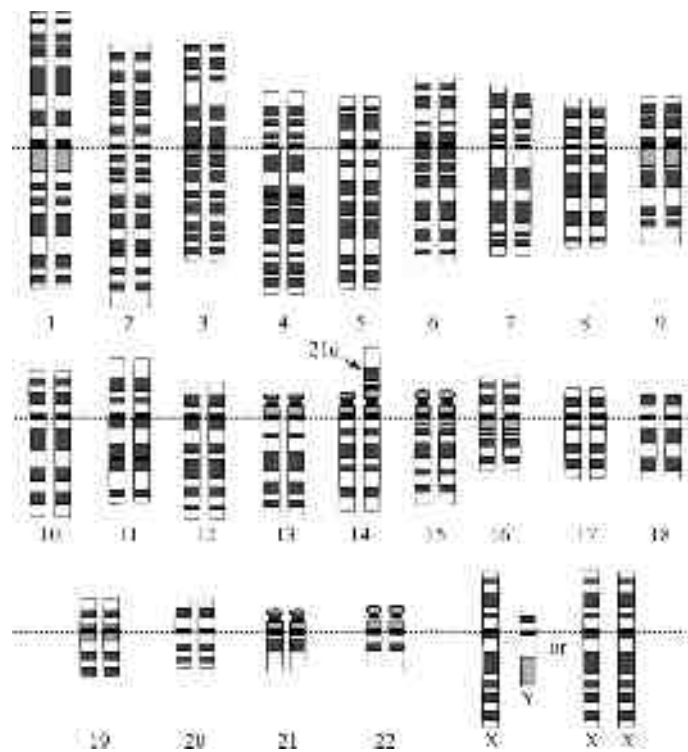


Figure 1b. Schéma d'un caryotype humain porteur d'une trisomie 21 par translocation robertsonienne, avec fusion du troisième bras long du chromosome 21 sur le bras court du chromosome 14.

1.3. Caractéristiques phénotypiques associées au Syndrome de Down

Les phénotypes associés au SD ne sont pas partagés avec la même fréquence et le même degré d'expression entre les individus. Par exemple, les dysmorphies physiques, les déficiences intellectuelles, l'apparition de la maladie d'Alzheimer ou encore l'hypotonie musculaire sont retrouvées chez 100% des patients. En revanche la brachycéphalie ou les malformations cardiaques congénitales n'apparaissent que dans 75% et 40% des cas, respectivement. Le degré de variabilité de ces caractéristiques a été corrélé à une variabilité dans l'expression des gènes localisés sur le chromosome 21 (Antonarakis et al., 2004). La liste des descriptions qui vont suivre des traits les plus communément observés chez les personnes porteuses de trisomie 21 est non-exhaustive.

1.3.1. Dysmorphies physiques

Les individus atteints du SD sont en général facilement reconnaissables par les dysmorphies physiques qu'ils présentent. Ces caractéristiques concernent majoritairement la tête, le cou et les extrémités des membres.

Ainsi, ils manifestent souvent une brachycéphalie avec un visage rond et la tête aplatie à l'arrière (**Figure 2a**). Les yeux sont en forme d'amande, et sont situés légèrement plus bas et de manière oblique avec un épicanthus interne c'est à dire des replis cutanés dans le coin interne de l'œil (**Figure 2b**). L'arête du nez est plus petite que la normale lui donnant une forme aplatie. Les oreilles tombantes sont ancrées de manière plus basse sur la tête. Ils ont souvent la bouche entrouverte et ont tendance à manifester une protrusion de la langue. Le cou est plus court et plus large avec un excès de peau, c'est d'ailleurs un des critères spécifiques au SD détectable lors d'une échographie. Les mains sont courtes et larges avec le cinquième doigt incurvé présentant une hypoplasie de la deuxième phalange. On peut également observer la présence d'un unique pli palmaire transverse (**Figure 2c**). Enfin, au niveau des pieds, on retrouve un espace entre le premier et le second orteil (**Figure 2d**) (Sureshababu et al., 2011).

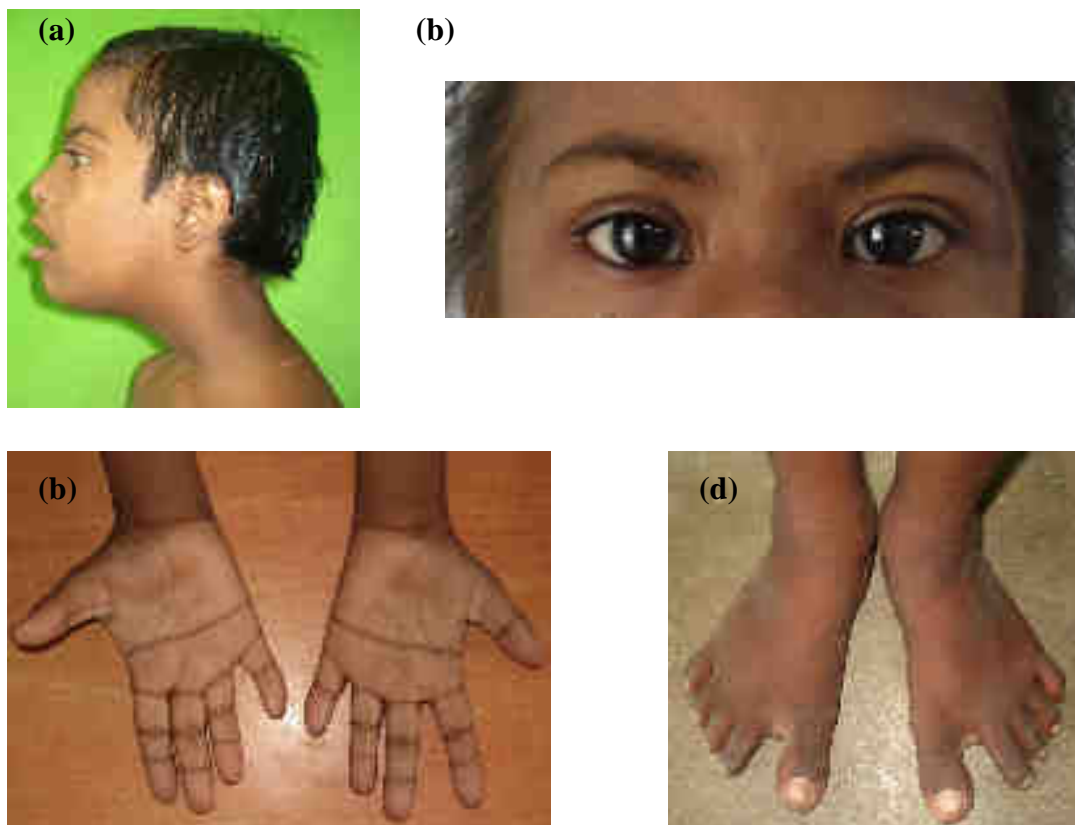


Figure 2. Dysmorphies physiques d'un enfant atteint de la T21. (a) Brachycéphalie. (b) Epicanthus interne. (c) Unique pli palmaire transverse, hypoplasie de la 2^e phalange de l'auriculaire. (d) Espace entre le premier et le second orteil. (Sureshbabu et al., 2011)

1.3.2. Pathologies associées au Syndrome de Down

Malformations cardiaques. Environ la moitié des patients porteurs de T21 naît avec des problèmes cardiaques congénitaux. Selon une large étude issue de The Atlanta Down Syndrome Project basée sur une population de 243 nouveaux nés atteints du SD résidants dans cinq comtés de l'état d'Atlanta, 93% ont pu bénéficier d'un diagnostic cardiaque. Les résultats montrent que 44% des cas ont manifesté des anomalies cardiaques congénitales. Ainsi, ce sont des défauts au niveau du septum ventriculaire et atrio-ventriculaire qui ont été principalement rencontrés (Dennis et al., 2010; Freeman et al., 1998). A noter que certains chez qui aucune malformation cardiaque n'a été détectée à la naissance, développent tout de même à l'âge adulte des problèmes valvulaires (Geggel et al., 1993; Hamada et al., 1998).

Anomalies gastro-intestinales. Les risques de malformation gastro-intestinale sont également augmentés chez le fœtus porteur de la T21 et surviennent dans environ 5% des cas. On rencontre principalement une sténose (absence incomplète) ou une atrésie (absence complète) de la lumière du duodénum (Fabia and Drolette, 1970). De plus, une forte corrélation a été établie entre le Syndrome de Down et une des maladies digestives la plus fréquente de nos jours, la maladie cœliaque. On estime qu'elle représente une augmentation de 5 à 16 fois chez la population trisomique par rapport à la population générale (Book et al., 2001; Zachor et al., 2000).

Pathologies pulmonaires. Un sondage australien réalisé entre 1997 et 2004 auprès de parents d'enfants atteints de T21 a permis de montrer que sur 208 enfants, 60% étaient touchés par des problèmes respiratoires incluant l'asthme et l'apnée du sommeil (Thomas et al., 2011). D'autres complications pulmonaires sont également fréquentes telles que des altérations dans la vascularisation pulmonaire ou encore des maladies liées au parenchyme pulmonaire (McDowell and Craven, 2011). La vulnérabilité pulmonaire rencontrée chez les personnes affectée par le SD représente une des premières raisons de leur hospitalisation et également une des premières causes de mortalité selon une étude réalisée aux USA entre 1983 et 1997 (Day et al., 2005; Yang et al., 2002).

Problèmes hématologiques. Des anomalies d'ordre hématologique sont également décrites dans la population touchée par le SD. Ainsi environ 1% des cas manifeste une leucémie (Lange, 2000), 65% présentent une polycythémie c'est à dire une augmentation de la quantité totale d'érythrocytes circulants (Kivivuori et al., 1996) et enfin une macrocytose et une leucopénie ont également pu être rapportées (Roizen and Amarose, 1993).

Troubles oculaires et auditifs. La majorité des enfants porteurs du SD manifestent des anomalies oculaires telles que des troubles de la réfraction, à savoir la myopie, l'hypermétropie et l'astigmatisme (35 à 76%) ou encore du strabisme (25 à 57%). De plus, 18 à 22% des cas peuvent présenter des mouvements involontaires et saccadés des globes oculaires, appelés nystagmus. La fréquence d'apparition de ces troubles augmente avec l'âge : 38% des enfants

entre 2 et 12 mois sont touchés, chiffre qui atteint 80% chez les 5 à 12 ans (Creavin and Brown, 2009; Hestnes et al., 1991; Roizen et al., 1994). En plus des défauts oculaires, 38% à 78% des patients sont également sujets à une perte d'audition et présentent 50% à 70% plus de risques de développer des otites par rapport à la population normale (Bull and Genetics, 2011; Roizen et al., 1993; Shott et al., 2001).

Hypotonie musculaire. La faiblesse du tonus musculaire est un trait commun à tous les individus porteurs de la T21. Très marquée, elle a pour conséquence une mauvaise posture corporelle, une acquisition tardive de la marche et de la préhension des objets mais également du langage causée par des difficultés dans l'articulation de la mâchoire (Melyn and White, 1973). Cette hypotonie s'accompagne d'une hyperlaxité ligamentaire conduisant à un manque d'habileté dû à une perte de contrôle dans les mouvements (Tsao and Mellier, 2005; Vicari, 2006). De manière générale, la motricité des enfants atteints du SD est diminuée par rapport aux enfants ayant un développement normal et l'écart dans les compétences motrices se creuse davantage avec l'âge.

Maladie d'Alzheimer. Grâce aux progrès de la médecine et aux avancées dans la prise en charge des pathologies liées au SD, l'espérance de vie de la population touchée par la T21 a considérablement augmenté. De 12 ans en 1949, elle est passée à 55 ans de nos jours et on estime que 25% des patients atteints du SD dépasseront les 60 ans (Glasson et al., 2002). En conséquence de cette longévité croissante, les individus atteints de la T21 sont donc plus susceptibles aux pathologies associées au vieillissement tel que la démence et spécialement la maladie d'Alzheimer. En effet, ils sont plus vulnérables au développement de cette pathologie du fait de la surexpression de gènes associés à la maladie sur le chromosome 21. C'est le cas par exemple du gène codant pour la protéine APP qui est responsable de la génération de peptides amyloïdes conduisant à la dégénérescence des neurones (Head and Lott, 2004).

1.3.3. Dysfonctions cognitives

Les déficiences intellectuelles représentent le trait caractéristique le plus frappant chez les individus porteurs de T21. Les déficits peuvent être plus ou moins prononcés selon les cas et touchent différents aspects cognitifs décrits ci-après.

Le quotient intellectuel. D'après une étude portée sur 56 enfants, adolescents et jeunes adultes italiens atteints du SD, le quotient intellectuel (QI) a été déterminé au niveau modéré (QI = 71) à sévère (QI = 28) avec une moyenne se situant à 44,7 (Vicari et al., 2004). Ce chiffre est conforté par une autre étude américaine incluant 20 patients âgés entre 22 et 58 ans dont le QI variait entre 45 et 66 (moyenne QI = 50,7) (Nelson et al., 2005). Il est important de garder en mémoire que les écarts s'expliquent par les différences dans la qualité de vie de l'enfant durant son développement, qui dépend de la capacité des parents et de son entourage à apporter un cadre de vie plus ou moins stimulant. Ainsi, ses performances intellectuelles seront d'autant plus développées que l'enfant se trouve dans un environnement enrichi par les outils d'apprentissage nécessaires mis à sa disposition. Les travaux de Vicari et al. (2004) montrent que le QI décroît au fur et à mesure que l'enfant grandit : le QI des enfants âgés entre 6 et 8 ans se situe dans une fourchette de 45 à 71, tandis que les adolescents et jeunes adultes (entre 12 et 26 ans) présentent un QI diminué (28 à 47). Le QI a donc tendance à chuter avec l'âge (Carr, 2005; Oliver et al., 1998) et la détérioration des capacités mnésiques augmente notamment de manière drastique lorsque le sujet adulte est atteint de démence (Bush and Beail, 2004).

Les fonctions exécutives et l'attention. Les individus touchés par le SD, adolescents et adultes, présentent des troubles dans leurs fonctions exécutives (Lanfranchi et al., 2010; Rowe et al., 2006). Ainsi, leur capacité d'inhibition est altérée, entraînant des comportements non adaptés aux situations qui les dépassent (Borella et al., 2013). Les tâches relatives à la planification telles qu'établir un programme ou gérer un plan d'action, sont également perturbées (Rowe et al., 2006), reflétant chez ces personnes une incapacité à anticiper et à concevoir la notion du temps. De plus, un déséquilibre dans la flexibilité mentale a aussi été rapporté chez les patients atteints de trisomie (Landry et al., 2012). Au niveau de l'attention, ils expriment par exemple des difficultés à se focaliser sur une information d'intérêt et ne sont pas capables de s'affranchir des éléments perturbateurs, de maintenir une attention auditive ou

visuelle continue, ou encore de réaliser plusieurs actions à la fois. Cela impacte donc leur capacité à prioriser les tâches, à rester concentré sur une action ou encore à être vigilant face à un danger potentiel, ce qui tend à diminuer nettement leur autonomie dans la vie quotidienne (Rowe et al., 2006).

La mémoire de travail. La mémoire de travail est « un système qui maintient temporairement les informations et les manipule pendant la réalisation de tâches comme la compréhension, l'apprentissage et le raisonnement » (Baddeley, 2010). A noter qu'elle se distingue de la mémoire à court terme qui implique uniquement la fonction de stockage sans traitement des données. Le concept de mémoire de travail a été introduit par Baddeley et Hitch en 1974 et mis à jour en 2010, dont le modèle proposé est composé de deux systèmes (**Figure 3**). Le premier est divisé en trois différentes sous-catégories : « la boucle phonologique » qui retient à très court terme l'information verbale sous forme de code phonologique et qui apparaît donc indispensable pour l'apprentissage du langage, « le calepin visuo-spatial » qui maintient temporairement l'information spatiale et visuelle et permet la génération des images mentales, et enfin le « tampon épisodique », à stockage limité, qui sert d'interface entre la mémoire de travail et la mémoire à long terme. Ce dernier permet la création d'une mémoire épisodique unifiée en combinant les informations visuelles et auditives. Le second système est l'administrateur central exécutif qui coordonne et traite les informations issues des trois systèmes auxiliaires cités précédemment et les stocke de manière temporaire.

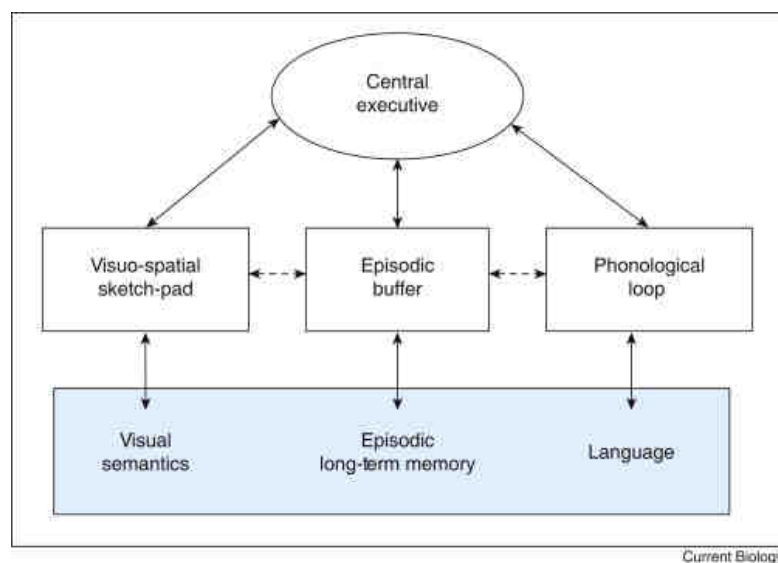


Figure 3. Schéma de la mémoire de travail (Baddeley, 2010).

Une étude réalisée sur un groupe de sujets atteints du SD âgés entre 7 et 18 ans a révélé que la mémoire de travail visuo-spatiale était plutôt préservée dans le syndrome tandis que celle relative au langage était affectée (Lanfranchi et al., 2009). Ce dysfonctionnement serait attribué à une diminution de la capacité de stockage de l'information dans la boucle phonologique (Baddeley and Jarrold, 2007; Gathercole and Baddeley, 1990). C'est ainsi que les individus porteurs de la T21 manifestent des troubles du langage.

La première forme de communication d'un nouveau-né se traduit par des balbutiements qui, chez le nourrisson touché par la T21, apparaissent au même moment qu'un enfant avec un développement typique (Cardoso-Martins et al., 1985). Les premiers retards dans l'apprentissage du langage se manifestent dès l'apparition des premiers mots. L'écart se creuse lorsque le vocabulaire et la syntaxe se complexifient (Iverson et al., 2003; Oliver and Buckley, 1994). Ainsi, tandis que les autres enfants acquièrent un vocabulaire enrichi et varié et composent des phrases de plus en plus complexes, celui des enfants atteints de T21 reste sommaire et pauvre en mot-outils (pronom, déterminant, etc) dû à la diminution de l'empan de la mémoire phonologique. Par conséquent, la communication reste télégraphique c'est-à-dire que la construction syntaxique est réduite à son strict minimum (Vicari et al., 2000). Ce retard persiste d'ailleurs jusqu'à l'âge adulte où le langage réceptif est également limité : pour faire sens du message qui leur est adressé, ils s'appuient souvent sur des indices lexicaux et situationnels (Rondal and Comblain, 1996). Cependant, chez certains cas, il ne peut être exclu que les troubles du langage ne soient pas seulement dus au retard cognitif mais qu'ils soient aussi fortement aggravés par les pertes auditives mentionnées précédemment ou encore par une réduction de la motilité de la langue dû à l'hypotonie musculaire (Hamilton, 1993).

La mémoire à long terme. On distingue deux types de mémoire à long terme. Tout d'abord la mémoire explicite qui recouvre la mémoire sémantique, c'est-à-dire l'ensemble des connaissances pratiques et théoriques acquises et conservées, et la mémoire épisodique qui constitue les souvenirs des événements vécus. Cette mémoire, également appelée mémoire déclarative, permet un rappel conscient des informations ou des expériences, contrairement à l'autre type de mémoire à long terme qu'est la mémoire implicite. Celle-ci se manifeste dans l'action et concerne la mémorisation des habiletés motrices, cognitives ou verbales. Ainsi, les travaux de Carlesimo et al., 1997 ont démontré que la mémoire explicite chez 15 patients atteints du SD était perturbée, tandis que leur performance dans les tests permettant de mesurer leur mémoire implicite était similaire au groupe contrôle.

1.3.4. Anomalies cérébro- et neuro-structurales

Les phénotypes caractéristiques de la trisomie 21 décrits précédemment peuvent être corrélés avec les anomalies structurales du cerveau. En effet, des études neuro-anatomiques par IRM (Pinter et al., 2001) ont révélé une réduction du volume cérébral total de 18% chez les personnes atteintes de T21 dont la diminution ne touche que certaines sous-structures en particulier. On observe ainsi une hypoplasie du cervelet, région connue comme étant le siège de la régulation de la fonction motrice et de la coordination des mouvements fins. Une diminution du volume cérébelleux peut donc expliquer les pertes de contrôles gestuels ou encore les problèmes d'articulation rencontrés chez ces patients. En outre, il a été montré qu'une altération au niveau de cette structure peut également affecter les fonctions non-motrices telles que les différentes fonctions exécutives ou encore la mémoire verbale à court terme comme observé chez des personnes présentant des lésions au niveau du cervelet (Schmahmann and Sherman, 1997). S'associe à cela une réduction du volume du lobe frontal et du lobe temporal (Pinter et al., 2001). A noter que le lobe frontal régule la planification, le raisonnement ou encore l'attention tandis que le lobe temporal est important pour l'acquisition du langage et la mémorisation. L'altération de la mémoire explicite à long terme observée chez les individus touchés par la T21 peut également être associée à la diminution de la taille de l'hippocampe qui est fortement impliquée dans les processus de mémorisation (Aylward et al., 1999). Les travaux de Aylward et al. (1999) ont en outre montré que l'amygdale diminuait aussi de taille et uniquement lorsque le sujet porteur de la T21 était atteint de démence, l'amygdale étant le lieu de contrôle des réactions émotionnelles. Une analyse par IRM plus centrée sur la morphologie de la substance grise sur 6 sujets porteurs du SD a révélé que les ganglions de la base étaient préservés (Jernigan et al., 1993). Or le rôle des ganglions de la base dans la mémoire implicite à long terme est maintenant connu grâce aux travaux de van der Graaf et al. (2004), ce qui expliquerait que la mémoire procédurale chez ces individus soit intacte.

D'un point de vue cellulaire, une diminution du nombre de neurones a été décrite au niveau hippocampique chez des fœtus trisomiques de 17 à 21 semaines (Guidi et al., 2008). De plus, on observe également un retard de myélinisation postnatal chez des enfants âgés jusqu'à 5 ans (Wisniewski, 1990). Ce phénotype a été confirmé par IRM deux ans plus tard chez une fillette de 18 mois atteinte de SD (Koo et al., 2016). Enfin, on observe une diminution de la synaptogenèse durant le développement de l'enfant et une dégénérescence accrue des dendrites à l'âge adulte (Takashima et al., 1994).

1.4. Le chromosome 21 et la région chromosomique du syndrome de Down (DCR)

Le chromosome 21 acrocentrique, le plus petit des autosomes humains, a été séquencé quasi intégralement en l'an 2000. 33,8 Mb ont été séquencés sur le bras long (21q) et 0,2 Mb sur le bras court (21p). Ce chromosome est considéré comme un chromosome pauvre en gènes puisque seulement 225 gènes codants ont été identifiés sur les 33,8 Mb du 21q (contre 545 gènes dans les 33.4 Mb du chromosome 22 par exemple) (Hattori et al., 2000).

La présence de trois copies de ce chromosome 21 donne ainsi lieu au Syndrome de Down. Des études de corrélation génotype – phénotype réalisées sur des individus porteurs d'une trisomie 21 partielle ont permis de mettre en lumière une région sur le chromosome 21q dont la duplication était responsable des phénotypes rencontrés dans le SD (Delabar et al., 1993; Korenberg et al., 1990; Rahmani et al., 1989). On nomme cette région la « Down syndrome Chromosomal Region » ou DCR. Elle s'étend sur 2,5 Mb et contient les gènes localisés entre *CBRI* (gène codant pour l'enzyme carbonyle réductase) et *ERG* (gène codant pour un facteur de transcription de la famille des ETS) (**Figure 4**).

Les chercheurs se sont donc focalisés sur cette région critique notamment pour identifier des gènes candidats associés aux pathologies caractéristiques du SD. Ainsi, parmi les études de corrélation génotype-phénotype, une analyse réalisée sur une région plus restreinte et ciblée de la portion DCR chez 8 individus porteurs d'une petite trisomie 21 partielle a permis d'identifier la protéine « Down Syndrome Cell Adhesion Molecule », ou DSCAM, comme un gène candidat contribuant aux anomalies cardiaques congénitales (Barlow et al., 2001).

L'identification de gènes candidats associés aux différentes pathologies observées dans le SD est donc essentielle avant d'envisager un traitement thérapeutique ciblé. Cependant, disséquer de manière précise tous les gènes candidats uniquement par l'étude des cas de trisomie 21 partielle reste une approche limitée. En effet, ces sujets sont rares, ils ne représentent que 5% de la population trisomique totale. Le recours aux modèles animaux apparaît donc nécessaire pour mener ces études puisqu'ils offrent l'accès à un plus grand nombre de sujets, à des tissus d'intérêt plus variés (dont le cerveau) et permettent d'explorer des pistes thérapeutiques.

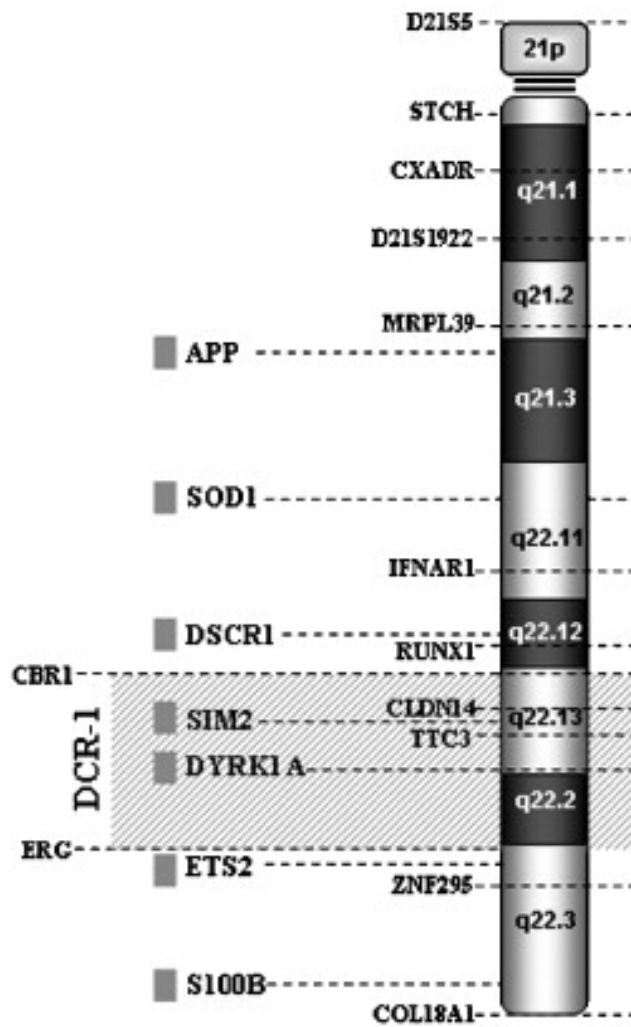


Figure 4. Représentation de la DCR sur le chromosome 21 comprise dans l'encadré grisé (adapté de Rachidi and Lopes, 2008).

1.5. Les modèles murins du Syndrome de Down

Les gènes murins orthologues du chromosome 21 humain (Hsa21) sont localisés de manière synténique sur trois différents chromosomes murins (Mmu) : Mmu10, Mmu16 et Mmu17 (Figure 5).

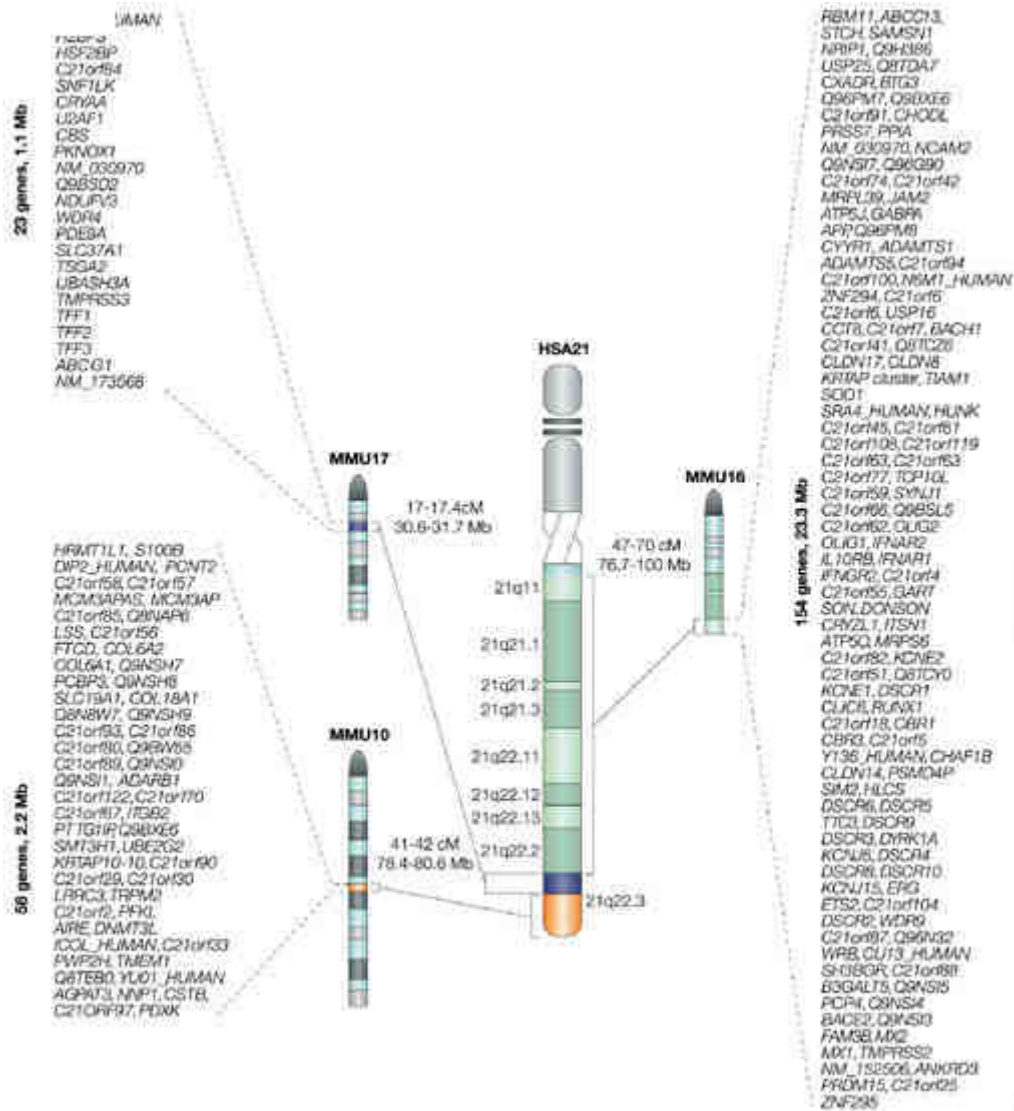


Figure 5. Répartition synténique des gènes murins orthologues aux gènes du chromosome Hsa21 sur les chromosomes Mmu10, Mmu16 et Mmu17 (Antonarakis et al., 2004)

Afin de mieux comprendre les relations génotype-phénotype du SD, quelques modèles murins de trisomie partielle comprenant la DCR ont été créés (**Figure 6**)

Le modèle Ts(17¹⁶)65Dn appelé Ts65Dn. Ce modèle, établi par translocation réciproque, est trisomique pour 132 gènes de la partie distale du chromosome MMU16 et d'une partie centromérique du chromosome MMU17. La région dupliquée contient donc la DCR mais également 5% de gènes du chromosome MMU17 qui sont non orthologues à ceux du chromosome 21 humain. Malgré la présence de ces gènes supplémentaires, les Ts65Dn ont été largement utilisées pour récapituler certains phénotypes associés au SD (Duchon et al., 2011; Reinholdt et al., 2011). En effet, ces souris présentent un retard de croissance, une faiblesse musculaire ainsi que des malformations faciales (Reeves et al., 1995). Une réduction du volume cérébelleux rappelle également le phénotype observé chez les patients du SD (Baxter et al., 2000). De plus, elles sont déficitaires dans l'apprentissage et la mémorisation spatiale, notamment au niveau de la flexibilité cognitive, et ont une mémoire de reconnaissance perturbée (Goodliffe et al., 2016; Olmos-Serrano et al., 2016; Torre et al., 2014). Des analyses ultra-structurales des synapses ont mis en évidence des anomalies au niveau des épines dendritiques et des boutons terminaux qui apparaissent plus larges, ainsi qu'une diminution de la densité des épines dendritiques et des cellules granulaires du gyrus denté (Belichenko et al., 2004).

Le modèle Dp1Yey. Bien que le modèle précédent exprime la plupart des traits caractéristiques du SD, l'observation de certains phénotypes pourrait être biaisée par la surexpression de gènes du MMU17 non orthologues à ceux du chromosome 21 humain. De ce fait, un autre modèle murin de la trisomie 21 plus pertinent a été développé (Li et al., 2007). Il s'agit du modèle Dp1Yey, trisomique pour toutes les régions de synténie entre le chromosome HSA21 et le chromosome MMU16, il contient donc 113 gènes orthologues. L'analyse morphologique des embryons de 18.5 jours révèle des malformations cardiaques et gastro-intestinales dans 37% des cas, similaires à celles diagnostiquées chez les patients touchés par la T21 (Li et al., 2007). Des anomalies postnatales ont également été décrites telles que des dysmorphies cranio-faciales incluant une brachycéphalie et une réduction de la taille des os de la mâchoire. La taille du cervelet est réduite et est accompagnée d'une diminution du nombre de cellules granulaires (Starbuck et al., 2014). En outre, ces animaux présentent un retard des

capacités d'apprentissage, une moins bonne mémoire spatiale ainsi qu'une altération de leur mémoire associée au contexte comparé aux animaux sauvages. S'associent à cela des défauts dans la plasticité synaptique puisqu'une diminution du potentiel d'action à long terme (LTP) a également été observée dans ce modèle (Yu et al., 2010).

Le modèle Ts1Cje. Ce modèle a été obtenu par erreur génétique dans le laboratoire du Dr. Epstein lors du ciblage du gène *Sod1* chez la souris. Il s'est avéré qu'une partie des descendants présentait une translocation de la partie distale située entre les gènes *Sod1* et *Mxl* du chromosome MMU16 sur le chromosome MMU12 (Sago et al., 1998). Ce modèle est donc trisomique pour 94 gènes du MMU16 et couvre environ 67% de la région trisomique des Ts65Dn. Comme ces dernières, les Ts1Cje ont des déficits dans la mémoire spatiale (Andrade-Talavera et al., 2015; Sago et al., 1998). Les anomalies au niveau de la structure des synapses et des épines dendritiques présentes chez les Ts65Dn sont également présentes chez les Ts1Cje mais de manière moins sévère (Belichenko et al., 2007). De plus, bien que le volume cérébelleux est réduit à un même degré dans ces deux modèles, le nombre de cellules granulaires n'est pas affecté dans les Ts1Cje contrairement aux Ts65Dn où ce nombre est significativement plus bas (Olson et al., 2004). La plasticité synaptique au niveau de l'hippocampe est également altérée (LTP diminuée, LTD augmentée) mais de manière moins dramatique que chez les Ts65Dn (Siarey et al., 2005).

Le modèle Tg(CEPHY152F7)12Hgc. Ce modèle a été établi par insertion d'un chromosome artificiel de levure (YAC) contenant un fragment de 570 kb d'ADN humain incluant les gènes *TTC3*, *DYRK1A* et *KCNJ6*. Sa création a été réalisée dans le cadre d'une étude plus détaillée de potentiels gènes candidats situés dans la région de la DCR pouvant induire les phénotypes liés au SD. Ainsi, 3 autres modèles basés sur cette stratégie ont été produits et chacun des 4 modèles expriment ainsi une triplification d'une région différente de la DCR. Les régions de surexpression étant contiguës et recouvrant toute la région critique, une comparaison phénotypique des 4 modèles a ainsi pu mettre en lumière le gène *DYRK1A* comme gène candidat responsable de la perte mnésique décrite dans le modèle Tg(CEPHY152F7)12Hgc également observée chez les individus porteurs de la T21 (Smith et al., 1995, 1997).

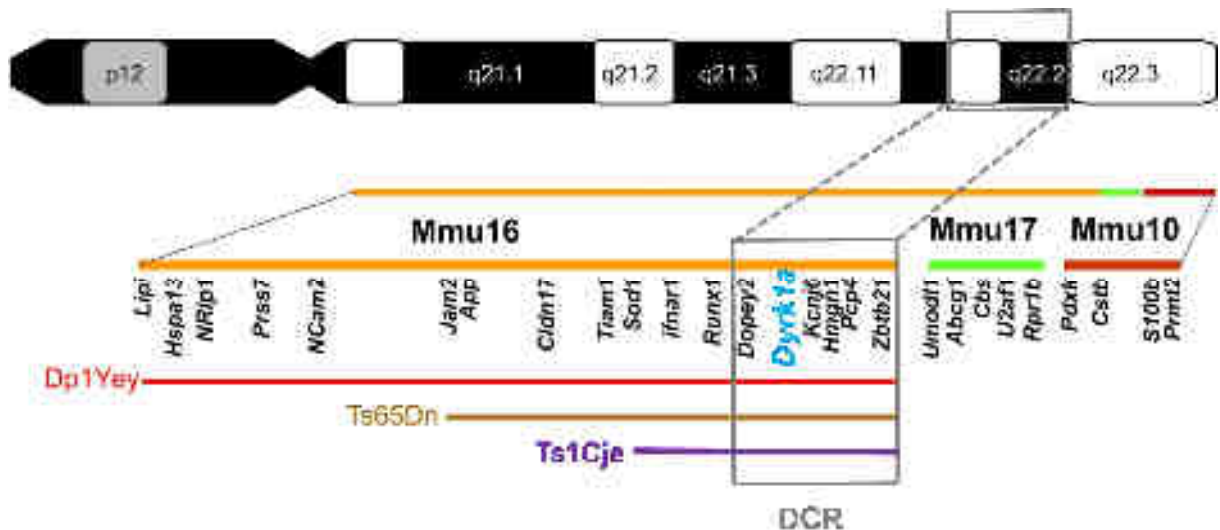


Figure 6. Quelques modèles murins de trisomie 21 partielle : Dp1Yey, Ts65Dn et Ts1Cje. Le chromosome 21 humain est représenté sur la partie supérieure. En regard se trouvent les chromosomes murins Mmu16, Mmu17 et Mmu10 synténiques aux différentes régions du Hsa21. Quelques gènes orthologues au Hsa21 sont listés en dessous de chaque chromosome, dont *Dyrk1a* comprise dans la région de la DCR (encadré gris). Schéma adapté de Herault et al., 2017.

1.6. Phénotypes sensibles au dosage des gènes : lumière sur **DYRK1A**

Il semble que l'apparition des phénotypes associés au SD soit fortement dépendante du dosage des gènes localisés dans la région critique DCR. Cette hypothèse est renforcée par l'analyse du caryotype d'une famille manifestant un déficit intellectuel sans aucune malformation cardiaque. Or cette famille présentait une petite trisomie partielle de 4,3 Mb située entre la région 21q22.13 et 21q22.2 de la DCR dont la duplication concernait le gène *DYRK1A* mais pas le gène *DSCAM*. Cette découverte conforte bien le rôle de *DSCAM* dans les pathologies cardiaques caractéristiques du SD, comme décrit précédemment, mais renforce surtout le rôle de *DYRK1A* dans la diminution des performances intellectuelles des patients du SD (Ronan et al., 2009). Effectivement, ces déficits cognitifs sont également retrouvés dans les différents modèles murins de trisomie 21 partielle, mais surtout lors de la surexpression d'une petite région de la DCR contenant le gène *Dyrk1a* dans le modèle Tg(CEPHY152F7)12Hgc.

L'importance de ce gène a déjà été démontrée avec son homologue chez la drosophile appelé *minibrain* (*mnb*). En effet, une mutation du gène *mnb* conduit à une réduction de la taille des lobes optiques ainsi que des hémisphères cérébraux chez la drosophile adulte, suite à une diminution de la production des cellules neuroblastiques (Tejedor et al., 1995). Ces phénotypes ont également pu être retrouvés chez la souris hétérozygotes pour *Dyrk1a* (*Dyrk1a*^{+/-}) dont la taille du cerveau est réduite de 30% comparée à celle des animaux sauvages. Leur viabilité est également diminuée tandis que les souris homozygotes *Dyrk1a*^{-/-} meurent durant l'organogénèse. Les souris *Dyrk1a*^{+/-} possèdent un déficit dans l'apprentissage et dans la mémoire de reconnaissance (Arqué et al., 2008; Fotaki et al., 2002). Chez l'homme, une haploinsuffisance de *DYRK1A* conduit au syndrome MRD7 (« Mental Retardation autosomal Dominant 7 »). Les patients MRD7 présentent une microcéphalie, des problèmes de langage, de l'épilepsie ou encore des troubles autistiques (Courcet et al., 2012; Møller et al., 2008; Oegema et al., 2010; Valetto et al., 2012; Yamamoto et al., 2011).

Il apparaît donc clairement que *DYRK1A* tient un rôle primordial dans la régulation des fonctions cognitives. Ce gène constitue donc un très bon candidat pour l'établissement des déficits mnésiques associés au SD.

1.7. **DYRK1A**

1.7.1. Le gène

Le gène *DYRK1A* est localisé sur le chromosome 21 humain en 21q22.13 dans la région critique DCR et s'étend sur approximativement 150 kb. Neuf transcrits issus d'épissages alternatifs ont été décrits jusqu'à ce jour. Soixante et onze orthologues à *DYRK1A* ont été identifiés dont *Dyrk1a* chez la souris situé sur le chromosome 16qC4 ou encore chez la drosophile appelé *minibrain* (*mnb*) que l'on retrouve sur le chromosome X16E4-16E4. Enfin, on distingue 4 paralogues issus de la famille des DYRKs (Dual-specificity tyrosine-regulated kinases) à savoir *DYRK1B*, *DYRK2*, *DYRK3* et *DYRK4* (Données tirées de Ensembl).

1.7.2. La protéine

Le gène *DYRK1A* code pour la protéine kinase DYRK1A qui existe sous 2 principales isoformes de 763 et 754 acides aminés (Aranda et al., 2011). A noter qu'aucune différence fonctionnelle entre ces 2 isoformes n'a été rapportée à ce jour. DYRK1A appartient à la famille des DYRKs qui comprend aussi DYRK1B, DYRK2, DYRK3 et DYRK4. Dans le kinome eucaryotique, les DYRKs font partie du groupe CMGC qui inclut également la famille des cyclin-dépendant kinases (CDKs), les mitogène-activated protein kinases (MAP kinases), les glycogène synthase kinases (GSK) et les Ccd2-like kinases (CLKs) (**Figure 7**).

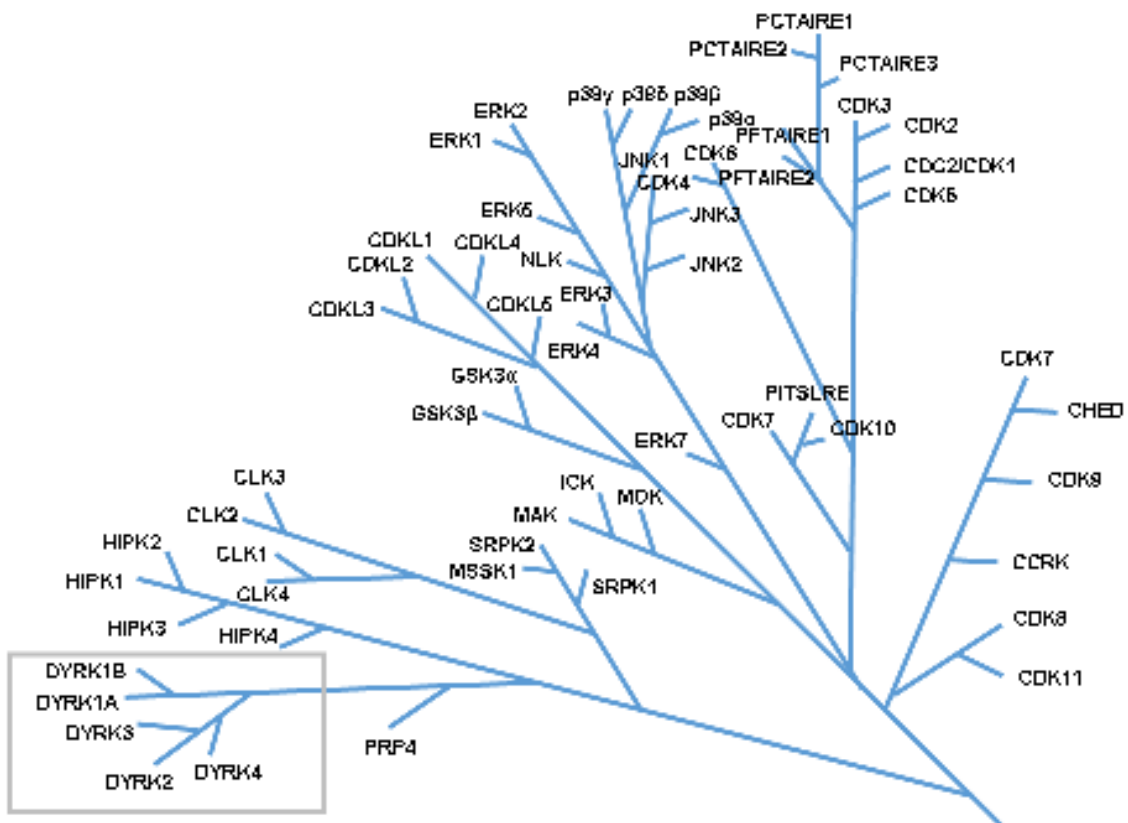


Figure 7. Arbre phylogénétique des classes de kinases CMGC avec un zoom sur la famille des kinases DYRKs.

Sa structure.

Toutes les protéines DYRKs conservent le même domaine catalytique ainsi qu'une séquence caractéristique de la famille appelée DH (DYRK Homology-box). Toutes sauf DYRK3 possèdent un domaine de signal de localisation nucléaire (NLS) en N-terminal. DYRK1A et DYRK1B partagent en plus un motif PEST au niveau du C-terminal nécessaire pour leur dégradation. Les trois autres DYRKs possèdent en commun un domaine NAPA qui leur apporte une fonction de chaperon nécessaire à l'autophosphorylation de leur résidu tyrosine. Ce domaine ne figure pas ni dans DYRK1A ni DYRK1B car l'autophosphorylation est une capacité intrinsèque à leur domaine kinase et ne dépend donc pas de la présence de protéines chaperons (Göckler et al., 2009a). DYRK1A possède un second domaine NLS dans son domaine kinase ainsi qu'une séquence poly-histidine de 13 résidus histidines consécutifs destinée à son adressage vers les compartiments nucléaires d'épissage (**Figure 8**).

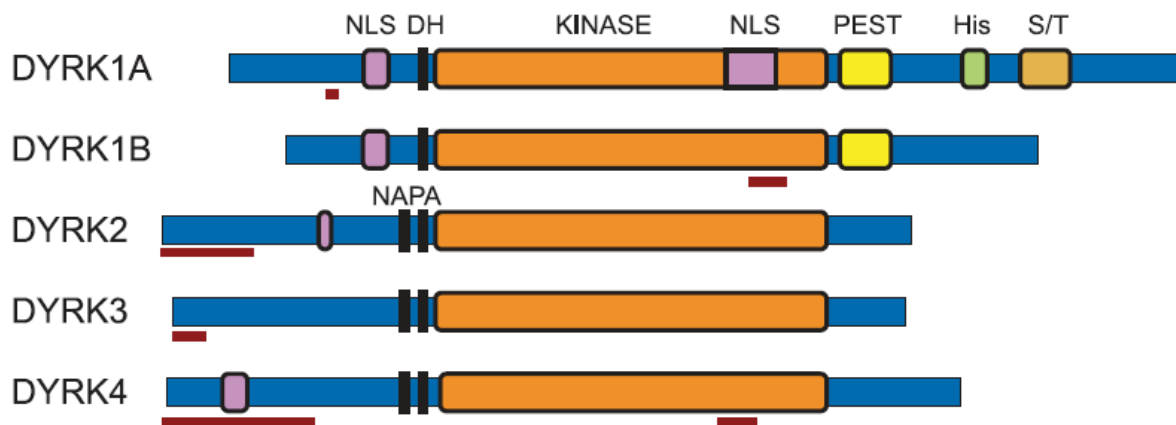


Figure 8. Schéma de la structure des 5 protéines DYRKs. NLS, signal de localisation nucléaire ; DH, DYRK-Homology box ; NAPA, région nécessaire à l'autophosphorylation située en N-terminal, Kinase, domaine kinase ; PEST, motif riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine ; His, séquence polyhistidine ; S/T, région enrichie en résidus sérine et thréonine (Aranda et al., 2011).

Son expression.

Chez l'homme, l'expression de DYRK1A est plutôt ubiquitaire (**Figure 9**). Au niveau du cerveau, elle est détectée dans la couche granulaire du cervelet, la couche externe corticale, l'hippocampe, la couche moléculaire externe du gyrus denté, l'amygdale, le thalamus et la substance noire. Sa localisation est à la fois cytoplasmique et nucléaire (Wegiel et al., 2004). De manière intéressante, le taux de DYRK1A ne varie pas entre les régions frontale, temporale et occipitale dans le cerveau de sujet adulte typique. En revanche, ce taux est augmenté chez les individus porteurs de la T21 avec une augmentation qui varie selon les lobes. Ainsi, celui-ci varie de manière décroissante au niveau du cortex frontal, temporal, occipital et cérébelleux (Dowjat et al., 2007). Chez la souris, DYRK1A est également présente au niveau cytoplasmique et nucléaire et est fortement exprimée dans le système d'olfaction incluant le bulbe olfactif et le cortex entorhinal, l'hippocampe, le cortex cérébelleux ainsi que la substance grise (Martí et al., 2003).

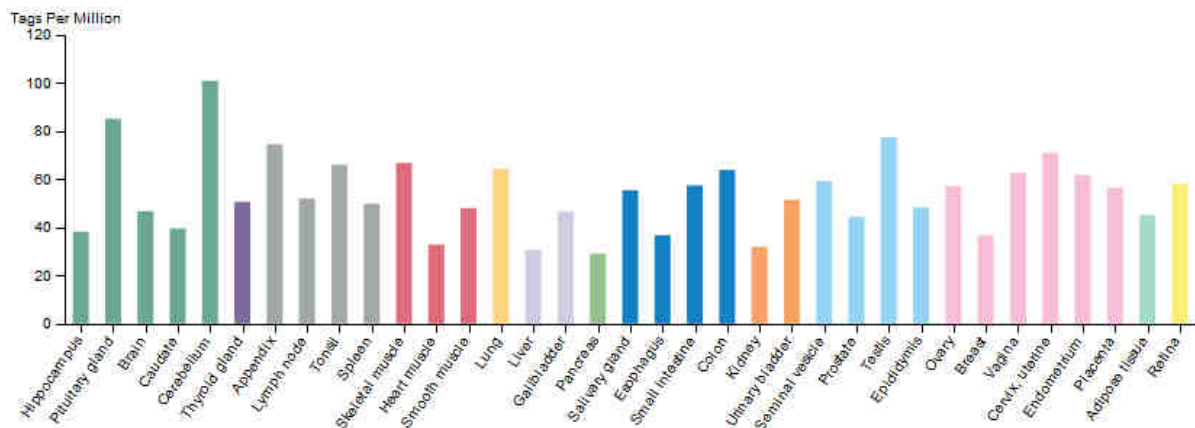


Figure 9. Expression tissulaire de DYRK1A. Données issues du projet FANTOM5 (The human protein Atlas)

Son activation.

Les protéines DYRKs sont définies comme des « Dual-specificity protein kinases » c'est-à-dire qu'elles sont capables de phosphoryler des résidus tyrosine, sérine et thréonine. Bien que la phosphorylation des tyrosines ait toujours été mentionnée pour être exclusivement réservée à l'autophosphorylation, les travaux de Walte et al., 2013 ont montré que DYRK1A est capable de phosphoryler *in vitro* des résidus tyrosine de deux protéines non-identifiées .

Comme la plupart des membres du groupe CMGC, la phosphorylation/déphosphorylation d'un résidu tyrosine conservé régule l'activité catalytique de la kinase. Pour DYRK1A, c'est la Tyr312 (isoforme de 754 aa) et la Tyr321 (isoforme de 763 aa) de la boucle d'activation qui doivent être autophosphorylées pour permettre la stabilisation de la conformation active de la kinase (Himpel et al., 2001). Lorsque la kinase adopte cette conformation active, le site d'interaction avec le substrat est bien positionné et accessible à la phosphorylation, la kinase est dite mature.

Sa régulation.

La régulation transcriptionnelle de *DYRK1A* a été peu décrite jusqu'à présent. Néanmoins des études ont rapporté que AP4 (activator protein 4) et son partenaire de co-répression geminin régulent négativement l'expression de DYRK1A dans des cellules non neuronales (Kim et al., 2006). A l'inverse, il a été décrit que le facteur de transcription E2F1 stimule l'activité promotrice de DYRK1A (Maenz et al., 2008). De plus, une accumulation du taux de DYRK1A dans les ostéoclastes a été observée en réponse à une augmentation du facteur nucléaire des lymphocytes T activés ou NFATc1 (Lee et al., 2009). Dans les cellules de neuroblastome humain, les peptides A- β 2 induit une sur-expression des ARNm de DYRK1A (Kimura et al., 2007). Enfin, le RE1 silencing transcription factor (REST) active la transcription de DYRK1A en se fixant sur le site consensus NRSE de la région promotrice du gène. Un déséquilibre du dosage de DYRK1A entraîne une diminution de l'expression de REST, indiquant ainsi une boucle de régulation négative de la kinase par REST (Canzonetta et al., 2008; Lu et al., 2011).

D'autres travaux suggèrent que DYRK1A serait modulée par l'interaction avec certaines protéines. Par exemple la protéine 14-3-3b est capable de se complexer à la partie N-terminale de DYRK1A doublant ainsi l'activité enzymatique de la kinase (Alvarez et al., 2007). Des essais kinases ont également révélé que la protéine adaptatrice Ran-binding Protein M était capable d'inhiber l'activité catalytique de DYRK1A (Zou et al., 2003). En outre, la surexpression de WDR68 (aussi appelé HAN11) régulerait négativement DYRK1A (Morita et al., 2006). Enfin, deux protéines de la famille des SPRED (Sprouty-related protein with an EVH1 domain), SPRED1 et SPRED2 seraient capables d'interagir directement avec le domaine catalytique de DYRK1A et d'inhiber ainsi l'activité de la kinase vis-à-vis de ses substrats Tau et STAT3 (Li et al., 2010).

Ses fonctions.

Des études de perte de fonction ou de surexpression de la protéine DYRK1A ont permis d'identifier quelques rôles de la kinase, notamment dans le développement neuronal. Effectivement, il a été montré que les embryons mutants homozygotes nuls pour le gène (*Dyrk1a*^{-/-}) ne sont pas viables et meurent dans les alentours de 10.5 à 13.5 jours embryonnaires. De plus, la diminution drastique du nombre de cellules neuronales post-mitotiques ainsi que les analyses de localisation cellulaire de DYRK1A chez ce modèle comparé à des contrôles ont suggéré son rôle crucial dans le développement du cerveau (Fotaki et al., 2002b). En effet, chez des souris hétérozygotes pour *Dyrk1a* (*Dyrk1a*^{+/-}), une réduction du nombre de branchements et des épines des neurones pyramidaux du cortex a été observée (Benavides-Piccione et al., 2005). L'implication de DYRK1A dans la formation des neurites est validée par la perturbation de la neuritogenèse induite par un inhibiteur de la kinase, l'Harimine, sur des cultures de neurones hippocampiques (Göckler et al., 2009b). D'autres travaux ont montré que, dans une lignée cellulaire de phéochromocytome PC12, la surexpression de DYRK1A stimule la différenciation prématurée de ces cellules en augmentant l'activité de la Ras/MAP kinase connue pour son rôle dans la différenciation cellulaire (Kelly and Rahmani, 2005).

L'interaction de DYRK1A avec ses substrats a également permis de déduire ses fonctions dans différents processus cellulaires et voies de transduction du signal. A noter que DYRK1A a été identifiée comme une « proline-directed kinase » c'est-à-dire qu'elle a une préférence à phosphoryler les substrats ayant une proline positionnée immédiatement en C-Ter du site de phosphorylation Ser/Thr (P+1 site). Ainsi, la séquence consensus optimale de phosphorylation de DYRK1A a été définie initialement comme Arg-Pro-X-Ser/Thr-Pro (R-P-X-S/T-P où X est un acide aminé variable S/T représentant les sites) (Himpel et al., 2000). Cependant, ce site consensus reste théorique et il n'est pas exclu que DYRK1A soit capable de phosphoryler des sites ne répondant pas à cette stricte séquence consensus. C'est le cas par exemple de la séquence R-L-(329)S-P du facteur de transcription Forkhead in rhabdomyosarcoma ou FKHR, du résidu L-T-A-(434)T-P du facteur d'épissage SF3b1/SAP155, ou encore du site R-P-A-(640)S-P de la Glycogen synthase kinase musculaire ou GSK3 (Graaf et al., 2006a; Skurat and Dietrich, 2004; Woods et al., 2001a). Ceci indique donc une certaine flexibilité de DYRK1A dans la reconnaissance de ses substrats.

Ainsi parmi les fonctions régulées par DYRK1A, on peut citer en premier lieu **(1) l'activité apoptotique**. En effet, DYRK1A est capable de phosphoryler la Caspase 9 sur la Thr125 qui est un événement crucial pour la protection des cellules de la rétine contre la mort cellulaire (Laguna et al., 2008; Seifert et al., 2008). Ceci a été confirmé par une étude en culture de cellules rénales d'embryon humain (HEK293) dont l'expression de DYRK1A a été supprimée, et qui a révélé une hypo-phosphorylation du résidu Thr522 de la protéine SIRT1 (NAD-dependent deacetylase sirtuin-1) entraînant l'apoptose (Guo et al., 2010). DYRK1A joue également un rôle dans **(2) la régulation du cycle cellulaire**, par son activité sur la Cycline-D1 (CycD1), acteur critique des phases G1/S pour la progression du cycle cellulaire. La CycD1 est destinée à la dégradation lorsqu'elle est phosphorylée par DYRK1A sur la Thr286, ce qui conduit les cellules à sortir du cycle cellulaire (Chen et al., 2013). Ces résultats ont été complétés par la découverte d'un autre substrat de DYRK1A, la protéine p27^{Kip1} partenaire complémentaire de la CycD1 dans la régulation de la transition de la phase G1. Lorsque celle-ci est phosphorylée par la kinase sur sa Ser10, la p27^{Kip1} s'accumule dans les cellules et les force à sortir du cycle et à se différencier (Soppa et al., 2014). **(3) L'endocytose synaptique** est une autre fonction attribuée à DYRK1A puisqu'elle phosphoryle plusieurs protéines issues d'un complexe d'endocytose clathrine-dépendante, la Dynamin-1 sur la Ser857, l'Amphiphysin-1 sur la Ser293 ou encore la Synaptojanin-1 sur plusieurs sites pour l'instant non identifiés. La phosphorylation/déphosphorylation de ces protéines régule leur association les unes avec les autres ou avec d'autres protéines accessoires de l'endocytose telle que l'Intersectin-1, indispensable à leur activité dans le recyclage des vésicules synaptiques clathrine-dépendantes (Adayev et al., 2006; Murakami et al., 2006; Yu Huang et al., 2004). Cette activité d'endocytose est d'ailleurs étroitement liée avec **(4) la plasticité synaptique**. Ce processus est régulé par DYRK1A par la phosphorylation *in vitro* de la Ser1048 de la sous-unité GluN2a des récepteurs au glutamate. Cette activation modifie la disponibilité membranaire des récepteurs, modulant ainsi la réponse synaptique dépendante du glutamate (Grau et al., 2014). DYRK1A contrôle également les **(5) processus liés au cytosquelette neuronal**. DYRK1A phosphoryle les protéines associées aux microtubules telles que MAP1B sur son résidu Ser1392. Ici, DYRK1A joue le rôle d'une « priming » kinase, c'est-à-dire que la phosphorylation de son substrat permet à ce dernier de devenir substrat d'une seconde kinase, la GSK3. Très récemment, la protéine β -Tubuline a également été identifiée, *in vivo* et *in vitro*, comme substrat de DYRK1A en Ser172 (Ori-McKenney et al., 2016a). La modulation de ces cibles associées au cytosquelette par la kinase contrôle donc la croissance microtubulaire des axones ainsi que la morphogenèse dendritique. Enfin, une dernière fonction proposée pour DYRK1A concerne **(6) l'activité**

d'épissage alternatif. En effet, le facteur d'épissage SF3b1 est phosphorylé par la DYRK1A sur la Thr434, cette phosphorylation étant augmentée dans des cellules sur-exprimant DYRK1A. Ce résidu est sous-phosphorylé lorsque l'expression de DYRK1A est inhibée (Graaf et al., 2006). La protéine ASF est aussi un autre facteur d'épissage cible de DYRK1A. Elle contrôle l'activité d'épissage alternatif de la protéine Tau. Trois sites de phosphorylation ont été caractérisés pour cette protéine : la Ser227, la Ser234 et la Ser238, dont la phosphorylation conduit ce facteur vers la machinerie d'épissage nucléaire (Shi et al., 2008).

1.8. Altérations des fonctions mnésiques associées au surdosage de DYRK1A

La description précédente des différentes fonctions gérées par la kinase DYRK1A ainsi que la liste de ses différents substrats n'est pas exhaustive (cf **Suppl. Table 1.** tirée de Duchon and Herault, 2016 pour une liste plus complète). Elle montre néanmoins son impact dans la régulation de multiples mécanismes biologiques et sous-tend que, dans le cas d'un déséquilibre du dosage de la kinase, ces processus peuvent être dramatiquement perturbés. Un déséquilibre en faveur d'un sous-dosage de *DYRK1A* conduit au syndrome MRD7 dont les phénotypes associés ont été décrits dans la section 1.6. A l'inverse, un surdosage de ce gène peut également être à l'origine des phénotypes mnésiques observés chez les individus porteurs de la T21. Afin de vérifier cela, des nouveaux modèles murins sur-exprimant le gène DYRK1A seul ont été créés afin de mieux comprendre l'importance et l'impact de son surdosage dans les fonctions cognitives associées au SD.

Le modèle Tg(MT1A-Dyrk1a). Ces souris ont été produites par surexpression d'un ADNc *Dyrk1a* de rat sous le contrôle d'un promoteur inductible exogène de la métallothionéine (Altafaj et al., 2001). Elles présentent à la naissance un retard du développement locomoteur qui se traduit par une apparition tardive de la marche ainsi qu'un manque de coordination. Ces déficits disparaissent au fur et à mesure que les souris grandissent. En revanche, à l'âge adulte, ces souris deviennent hyperactives et leur flexibilité cognitive, leur mémoire visuo-spatiale et mémoire de reconnaissance sont perturbées (Altafaj et al., 2001; Martínez de Lagrán et al., 2004; Torre et al., 2014). A l'échelle cellulaire, une diminution de la neurogenèse adulte ainsi qu'une réduction de l'arborisation dendritique corticale et du gyrus denté a été observée.

S'ajoute à cela un retard de croissance axonal dans des cultures de neurones corticaux de ces souris (Martinez de Lagran et al., 2012; Pons-Espinal et al., 2013).

Le modèle Tg(DYRK1A)36Wjs. Ce modèle a été obtenu par insertion d'un chromosome artificiel de bactérie (BAC) contenant la totalité du gène *DYRK1A* humain. Le poids du cerveau de ces animaux est plus lourd de 19% comparé aux animaux contrôles et aucune anomalie n'a été détectée dans les autres organes, indiquant dans ce cas le rôle spécifique de *DYRK1A* au niveau cérébral. Ces souris ne présentent pas non plus de défauts moteurs mais expriment en revanche des déficits d'apprentissage et de mémorisation visuo-spatiale. Ces altérations mnésiques sont accompagnées de perturbations dans l'activité synaptique au niveau de l'hippocampe (Ahn et al., 2006).

Le modèle Tg(Dyrk1a)189N3Yah appelé ici Tg(Dyrk1a). La construction de ce modèle a été réalisée également par insertion d'un BAC contenant cette fois-ci le gène entier *Dyrk1a* murin. Ces animaux présentent un retard de croissance visible jusqu'à 60 jours postnatal. Au-delà de cet âge, la taille des animaux transgéniques rattrape la taille et le poids des souris sauvages. A l'inverse, le poids cérébral des Tg(*Dyrk1a*) ne diffère pas de celui des souris contrôles jusqu'à 21 jours postnatal. Au-delà, celui-ci augmente progressivement jusqu'à atteindre 15% de poids supérieur à l'âge adulte. La morpho-analyse cérébrale de ces animaux montre une augmentation de l'axe dorso-ventral, de la taille du 3^e ventricule dorsal et des ventricules latéraux ainsi que de l'hippocampe et des noyaux thalamiques (Guedj et al., 2012). Sur le plan mnésique, les Tg(*Dyrk1a*) possèdent des problèmes moteurs et sont déficitaires dans la mémoire de travail et à long terme, dans l'apprentissage et la mémorisation spatiale ainsi que dans la flexibilité cognitive (Souchet et al., 2014). S'ajoute à cela une modification de la morphologie de l'arborisation dendritique corticale puisqu'une augmentation de la densité en épines dendritiques a été observée chez ces souris transgéniques provoquant ainsi des perturbations dans l'activité synaptique du cortex préfrontal (Thomazeau et al., 2014).

La seule surexpression du gène *Dyrk1a* dans ces trois modèles murins permet donc de reproduire certains déficits cognitifs sensiblement similaires à ceux observés dans les modèles portant une trisomie partielle, mais surtout à ceux diagnostiqués chez les sujets porteurs de la T21. Ces phénotypes peuvent être expliqués par une perturbation des fonctions régulées par *DYRK1A*. Par exemple en surphosphorylant la protéine p53 en Ser15, *DYRK1A* inhibe la

prolifération de neurones progéniteurs dans le cerveau d'embryon de souris Tg(*DYRK1A*)36Wjs (Park et al., 2010). Or la sortie prématurée du cycle cellulaire de ces neurones est suivie par leur différenciation précoce, ce qui a pour conséquence la réduction du pool de progéniteurs et donc la diminution de la densité neuronale dans le cerveau (Yabut et al., 2010) comme cela a pu être observé au niveau hippocampique chez le fœtus trisomique (Guidi et al., 2008). De plus, une réduction dans le nombre de neurones de projection corticaux a été observée dans les embryons de souris Tg(*DYRK1A*)36Wjs suite à la phosphorylation de la *CycD1* par *DYRK1A* bloquant les neurones progéniteurs corticaux correspondant en phase G1 (Najas et al., 2015). D'autres mécanismes régulant le développement neuronal sont aussi perturbés par le surdosage de *DYRK1A*. La kinase est capable d'interférer dans les voies de signalisation du facteur nucléaire des lymphocytes T activés ou NFAT, indispensable au développement neuronal (Nguyen and Di Giovanni, 2008). Ainsi, dans les souris Ts1Cje la surexpression de *DYRK1A* inhibe l'adressage de ce facteur vers le compartiment nucléaire des neurones progéniteurs conduisant à une diminution de neurones différenciés (Kurabayashi and Sanada, 2013). Egalement, les altérations des processus d'apprentissage et de mémorisation rencontrées chez les patients atteints de T21 sont sans doute liées à une diminution de l'activité d'endocytose des vésicules synaptiques. Ceci pouvant s'expliquer par l'hyper-phosphorylation par *DYRK1A* des acteurs de la machinerie d'endocytose cités dans le paragraphe précédent, comme observé dans les cultures de neurones hippocampiques sur-exprimant *DYRK1A* (Kim et al., 2010). Enfin, les processus de neuro-dégénérescence peuvent également être la conséquence d'une suractivité de *DYRK1A*. En effet, d'un point de vue physiologique, la protéine Tau, connue pour son rôle dans la stabilisation des microtubules, est phosphorylée par *DYRK1A* sur de nombreux résidus, dont la Thr212 (Woods et al., 2001b). Dans la T21, Tau subit une hyper-phosphorylation due au surdosage de *DYRK1A*, ce qui conduit à la perte de fonctions biologiques de la protéine et donc à une diminution de l'assemblage des microtubules. De plus, une phosphorylation anormale de Tau entraîne également une agrégation accrue de la protéine entraînant la dégénération neuro-fibrillaire et enfin la mort neuronale (Wegiel et al., 2011). Ce phénotype est accentué par l'hyper-phosphorylation de la protéine régulatrice de la calcineurine-1 (RCAN-1) par *DYRK1A* sur son résidu Thr192. En conséquence sa dégradation est inhibée et son interaction avec la calcineurine-1 (Caln) est maintenue, empêchant la Caln d'exercer son activité phosphatase sur Tau (Jung et al., 2011). L'apparition tardive de la maladie d'Alzheimer est associée avec le SD. Il a été montré que *DYRK1A* est capable de phosphoryler la Préséniline-1 (PS1) sur la Thr354. Lorsque cette dernière est hyper-phosphorylée, comme dans le SD, l'activité de la γ -sécrétase, l'une des protéases qui clivent APP, est alors augmentée,

ce qui provoque alors une production anormalement élevée de peptides β -amyloïdes, composants majeurs des plaques amyloïdes et responsables de la neuro-dégénérescence (Ryu et al., 2010).

L'altération mnésique caractéristique du SD semble donc être dépendante du dosage de DYRK1A et souligne l'impact majeur de ce gène dans la trisomie 21. Plus précisément, au vu des nombreux mécanismes biologiques qu'elle contrôle par son activité catalytique, c'est l'activité excessive de sa fonction catalytique qui paraît cruciale dans l'apparition des phénotypes cognitifs du SD.

1.9. DYRK1A, cible potentielle pour le traitement thérapeutique améliorant les performances cognitives des individus porteurs de la trisomie 21

Afin de confirmer le rôle essentiel de DYRK1A dans l'apparition des perturbations mnésiques associées au SD, certains chercheurs ont étudié les conséquences d'une normalisation du dosage du gène de la kinase dans des modèles murins de la T21. Ainsi, les premiers travaux ont été réalisés sur le modèle murin trisomique Ts65Dn dont le dosage spécifique de *Dyrk1a* a été normalisé par croisement avec des souris hétérozygotes *Dyrk1a*^{+/-} (García-Cerro et al., 2014) ou en inhibant partiellement son expression par injection au niveau de l'hippocampe d'ARN interférant shRNA(*Dyrk1a*) (Altafaj et al., 2013). Les résultats ont montré une atténuation des déficits d'apprentissage spatial et de la mémoire associative, accompagnée d'une correction de la plasticité synaptique de l'hippocampe. Au niveau cellulaire, la normalisation de *Dyrk1a* a restauré la prolifération et la différenciation des cellules hippocampiques du gyrus denté. Des études sur un autre modèle murin trisomique, les Dp1Yey qui ne possèdent plus que deux copies fonctionnelles de *Dyrk1a*, ont conforté les précédents résultats puisque leur mémoire de travail et associative a également été corrigée (Jiang et al., 2015).

La kinase DYRK1A et en particulier sa fonction catalytique, constitue donc une cible thérapeutique majeure pour l'amélioration des performances cognitives chez les individus porteurs de T21.

1.10. Les inhibiteurs pharmacologiques de DYRK1A

De manière générale, les kinases représentent une très bonne cible pour les molécules thérapeutiques (Roskoski, 2015; Wu et al., 2015, 2016). En effet, leur poche de liaison à l'ATP est un site idéal pour l'ancrage de la drogue qui va exercer son effet inhibiteur par compétition avec l'ATP. De nombreux inhibiteurs de l'activité catalytique de DYRK1A ont déjà été identifiés et caractérisés (voir revue en annexe de Nguyen et al., 2017), ils diffèrent par leurs structure, sélectivité et efficacité. Dans ce paragraphe, seules les molécules qui ont été caractérisées et qui ont donné des résultats pertinents seront présentées. On distingue deux types d'inhibiteurs sélectifs pour DYRK1A: ceux produits de manière synthétique et ceux d'origine naturelle.

1.10.1. Les inhibiteurs de DYRK1A synthétiques

INDY (Inhibiteur de DYRK1A). Cet inhibiteur possède une structure chimique proche de l'inhibiteur des CLK, le TG003 mais avec une efficacité d'inhibition de DYRK1A trois fois plus élevée et une concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) de 0,24 µM (Ogawa et al., 2010). Il a été montré dans les travaux de Ogawa et al. que son utilisation dans des cellules COS7 diminuait la phosphorylation de Tau-pThr212, site substrat connu de DYRK1A (Woods et al., 2001), de manière partielle à 3 µM puis complètement à 30 µM. La molécule est également capable de restaurer la voie calcineurin-NFAT initialement bloquée par la surexpression de DYRK1A (Arron et al., 2006) dans des cellules HEK293. Un dérivé de la drogue a été produit, la proINDY qui est plus lipophile pour sa perméabilité membranaire, ce qui permet son évaluation *in vivo*. Ce dérivé a donné les mêmes résultats *in vitro* sur la Tau-pThr212 et sur la voie calcineurin-NFAT. La proINDY a donc été administrée à des embryons de *Xenopus* qui présentaient des déformations au niveau des yeux et de la tête dus à une suractivité de DYRK1A, phénotypes totalement corrigés par le traitement.

Ce même groupe de chercheurs a très récemment identifié un nouvel inhibiteur de DYRK1A : la **FINDY (Folding Intermediate-selective inhibitor of DYRK1A)** (Kii et al., 2016). Celle-ci se différencie de l'INDY par sa capacité à inhiber l'autophosphorylation de DYRK1A sur son résidu Ser97 dans des cellules HEK293, conduisant à sa dégradation (IC₅₀ = 0,11 µM). En revanche, elle n'exerce aucune activité inhibitrice sur la phosphorylation de ses substrats. FINDY a également été testé *in vivo* dans le même modèle embryonnaire de *Xenopus*

présentant les malformations associées à la surexpression de DYRK1A ou DYRK1B. De manière intéressante, cet inhibiteur corrige les phénotypes du modèle sur-exprimant DYRK1A mais pas de celui qui sur-exprime DYRK1B, démontrant une sélectivité élevée.

CX-4945. Cet inhibiteur synthétique a également été découvert très récemment et est plus efficace *in vitro* que l'INDY ou la proINDY avec une IC₅₀ de 6,8 nM (Kim et al., 2016). Comme l'INDY, il exerce son activité d'inhibition par compétition avec l'ATP et est capable d'inhiber la phosphorylation des substrats de DYRK1A tels que Tau-pThr212, PS1 et APP-Thr668, dans des cellules HEK293 qui sur-expriment la kinase. De plus, la voie calcineurine-NFAT dérégulée par le surdosage de DYRK1A dans ces cellules est corrigée suite à l'administration de la CX-4945. Cette drogue a également montré son efficacité *in vivo* dans le modèle de la drosophile. L'hyperactivité de DYRK1A dans ce modèle conduit à des malformations au niveau des ailes. Les larves de drosophile ont subi une administration quotidienne de la drogue immédiatement après la naissance. L'amélioration de la morphologie des ailes a pu être observée dès la fin des deux semaines suivantes. L'inhibition de DYRK1A par la molécule a également été vérifiée chez un modèle murin trisomique pour le gène *DYRK1A* humain, les Tg(*DYRK1A*)^{36W}js. L'état de phosphorylation de Tau-pThr212 au niveau de l'hippocampe de ces souris a été analysé une demi-heure après une seule administration orale du composé. Les résultats ont montré que la CX-4945 normalisait cette phosphorylation à un niveau similaire à celui observé chez les animaux contrôles.

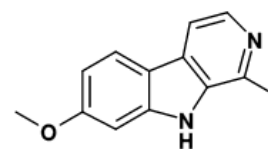
1.10.2. Les inhibiteurs de DYRK1A de source naturelle et dérivés

Harmine. Cet inhibiteur est un alcaloïde β -carbolinique issu d'une plante hallucinogène sud-américaine, *Banisteriopsis caapi* (Brierley and Davidson, 2012). Il agit également par compétition avec l'ATP et présente *in vitro* une IC₅₀ de 0,08 μ M (Bain et al., 2007). Mais il est capable également d'inhiber, avec une efficacité moindre, d'autres membres de la famille des DYRKs, comme DYRK2 (IC₅₀ = 0,9 μ M) et DYRK3 (IC₅₀ = 0,8 μ M). La capacité d'inhibition de l'activité kinase de DYRK1A a été validée dans des cultures de cellules HEK293 par une diminution dose-dépendante de la phosphorylation d'un de ses substrats, le facteur de transcription SF3B1-pThr434. En outre, dans des cultures de neurones hippocampiques,

l'harmine bloque la formation des neurites dépendante de l'activité catalytique de DYRK1A (Göckler et al., 2009c). D'autres travaux ont montré la capacité de la drogue à inhiber un autre substrat de DYRK1A, la protéine Tau sur les résidus Ser262/Ser356, Thr231 et Ser396 dans une lignée de neurogliomes H4. Le niveau de phosphorylation de ces sites est également diminué suite à la suppression de l'expression de DYRK1A par ARN interférant indiquant que ces résidus représentent bien des sites de phosphorylation spécifiques de la DYRK1A (Frost et al., 2011).



Banisteriopsis caapi

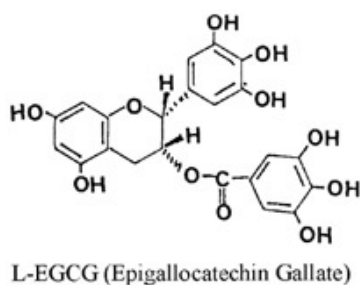


Harmine

Epigallocatechine gallate ou EGCG. Ce composé poly-phénolique majeur du thé vert est présenté comme un inhibiteur de DYRK1A efficace ($IC_{50} = 0,33 \mu M$) (McLauchlan et al., 2003). Contrairement aux autres inhibiteurs précédemment décrits, l'EGCG agit de manière non-compétitive avec l'ATP (Tatyana Adayev et al., 2006). Un traitement chronique à l'EGCG incorporé à la boisson et administré à des souris trisomiques, les Tg(CEPHY152F7)12Hgc, de la période gestationnelle jusqu'à l'âge adulte a permis de corriger certains phénotypes associés au surdosage de DYRK1A (Guedj et al., 2009). Il s'agit d'une réduction du volume cérébral et notamment du thalamus-hypothalamus ainsi que de la correction de la mémoire de reconnaissance à long terme mesurée dans le test de la reconnaissance du nouvel objet. De plus, le traitement à l'EGCG de cellules HEK293 induit une diminution de la phosphorylation de l'amphiphysine-1, substrat connu de DYRK1A (Guedj et al., 2009). Ces découvertes ont été confirmées peu de temps plus tard sur le modèle murin de trisomie partielle, Ts65Dn, puis sur les transgéniques Tg(MT1A-Dyrk1a) âgés de trois mois. Suite à un traitement chronique à l'EGCG administré oralement pendant 30 jours, l'apprentissage visuo-spatial mesuré dans la piscine de Morris ainsi que la mémoire de reconnaissance à long terme ont été restaurés.

L'EGCG a également été testé dans le cadre du déclin cognitif chez les souris Ts65Dn. Le traitement, combiné avec un enrichissement du milieu d'hébergement, a permis de restaurer les capacités d'apprentissage et de mémorisation visuo-spatiale (Catuara-Solarz et al., 2015).

Les travaux de Torre et al. en 2014 incluait également une cohorte de 29 patients âgés de 14 à 29 ans issus de la « Fundacio Catalana Sindrome de Down » à Barcelone. Ils recevaient chaque jour pendant 6 mois une dose orale de placebo ou d'EGCG à 9mg/kg/jour. A la fin du traitement, une batterie de tests mesurant différentes aptitudes cognitives a été effectuée. Les résultats ont révélé un effet correcteur significatif de leur mémoire épisodique et de leur mémoire de travail et une nette amélioration de leur mémoire de reconnaissance visuelle ainsi que de leur comportement social. Très récemment le composé a fait l'objet d'une étude clinique en phase 2 d'une durée de 12 mois. Les 84 participants âgés de 16 à 34 ans ont reçu comme précédemment une dose de placebo ou d'EGCG à 9 mg/kg/jour avec un entraînement cognitif supplémentaire. A la fin du traitement, une amélioration significative de leur mémoire de reconnaissance visuelle, de leur capacité de contrôle par inhibition et de leur comportement adaptatif a pu être observée (Torre et al., 2016).



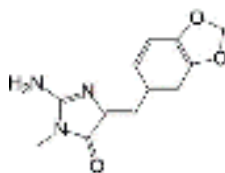
Camellia sinensis

Leucettine 41. Cet analogue synthétique dérivé d'un alcaloïde d'éponge marine (la Leucettamine B) présente une efficacité d'inhibition supérieure à l'Harmine et à l'EGCG avec une IC50 de 0,04 μ M (Debdab et al., 2011). De plus, la molécule se lie au site de fixation de l'ATP agissant donc de manière compétitive. La L41 a montré un rôle neuro-protecteur contre la cytotoxicité induite par le glutamate dans des cellules neuronales hippocampiques de souris en culture mais également contre la neuro-dégénérescence induite par l'APP dans des cultures de cellules corticales de rat (Tahtouh et al., 2012). L'effet protecteur a été à nouveau démontré

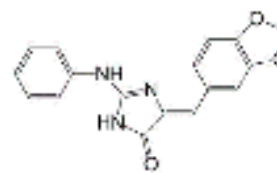
dans des souris modèles d'Alzheimer sujettes à une injection intra-cérébro-ventriculaire de peptides amyloïdes $\beta(25-35)$. En effet, la L41 a protégé ces souris du déclin cognitif induit par la présence de ce peptide, dans la mémoire de travail et la mémoire spatiale (Naert et al., 2015).



Leucetta microraphis



Leucettamine B



Leucettine L41

1.10.3. Tous inhibiteurs de DYRK1A mais...

Quelques défauts ont néanmoins été relevés pour chacun des inhibiteurs décrits précédemment. En effet, la Harmine est un analogue de la β -carboline connue pour ses effets hallucinogènes et psychoactifs induisant de l'anxiété, des convulsions, de l'excitation ou encore des tremblements. Une inhibition des récepteurs à la sérotonine et à la tryptamine par les β -carbolines seraient à l'origine de ces symptômes qui s'accompagnent d'ailleurs de perturbations dans l'activité électrique cérébrale (Airaksinen et al., 1987; Callaway et al., 1999; Fuentes and Longo, 1971). Il a également été démontré que la méthylation des β -carbolines mimait l'activité du métabolite neurotoxique MPP⁺ (1-méthyl-4-phenylpyridinium), qui converti en MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), altère le système dopaminergique dans le cerveau, conduisant ainsi aux symptômes caractéristiques de la maladie de Parkinson (Albores et al., 1990). Analogue de ce composé, l'Harmine est donc susceptible d'induire les mêmes conséquences psychiques puisqu'elle possède également la propriété d'inhiber la monoamine oxidase-A (MAO-A). Cette dernière étant impliquée dans la régulation de l'humeur et du comportement par son activité inhibitrice des récepteurs à la sérotonine, noradrénaline et dopamine (Kim et al., 1997). Ces effets toxiques associés à l'Harmine pénalisent donc son utilisation chez l'animal et chez l'homme.

Il a d'ailleurs été mentionné dans les travaux de Kim et al. que l'inhibiteur CX-4945 avait une structure chimique sensiblement similaire à celle de l'Harmine. A noter que dans ces

travaux, la drogue n'a jamais été testée sur une période suffisamment longue pour déterminer si elle présentait des effets toxiques. Ainsi, au vu de leur similarité structurale, il ne peut être exclu que la CX-4945 présente les mêmes impacts négatifs que l'Harmine.

Quant à l'EGCG, il possède une multitude de cibles et agit ainsi dans diverses activités biologiques telles que l'apoptose, le cycle cellulaire, la prolifération ou encore l'angiogenèse. On retrouve également certaines cibles de l'EGCG sensibles à des doses encore plus faibles que DYRK1A ($IC_{50} = 0,33 \mu M$). On peut citer par exemple la Vimentine ou encore le récepteur à la Laminine avec une IC_{50} de $0,003 \mu M$ et $0,04 \mu M$ respectivement (Khan et al., 2006; Yang et al., 2009). Le manque de sélectivité de ce composé rend donc difficile la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents à la restauration des phénotypes observés dans les études précliniques et cliniques d'ores et déjà réalisées. Il est également important de préciser que parmi les autres cibles de l'EGCG, se trouvent les récepteurs aux cannabinoïdes CB1 (Korte et al., 2010). Or ces récepteurs sont connus pour leur rôle dans la régulation du relargage des neurotransmetteurs dans différentes aires du cerveau telles que le cortex préfrontal ou encore l'hippocampe. Ils contrôlent donc les processus d'apprentissage et de mémorisation ainsi que la maintenance de l'humeur (Freund et al., 2003; Wilson and Nicoll, 2002). Ainsi, une interaction anormale avec les récepteurs CB1 peut dramatiquement déréguler l'activité synaptique entraînant des modifications dans le comportement. Ce fut d'ailleurs le cas pour le Rimonabant, un produit développé pour lutter contre l'obésité, qui agit comme agoniste inverse des récepteurs CB1. Celui-ci a été retiré du marché suite à ses graves effets secondaires qui dans les cas les plus sérieux ont mené à des cas de dépression et de suicide. Enfin, une étude sur une colonie de souris non consanguines a révélé qu'une administration quotidienne pendant trois jours d'EGCG à 50 mg/kg entraînait une toxicité hépatique sévère dans 16% des cas (Church et al., 2015). Ceci reflète les signes cliniques observés sur trente-quatre individus ayant consommé divers produits enrichies en thé vert entre 1999 et 2008 et qui ont déclaré des hépatopathies (Mazzanti et al., 2009).

Enfin, ni l'INDY / FINDY, ni la Leucettine 41 n'ont été jusqu'à présent caractérisés dans le modèle animal. Le seul avantage à noter pour la Leucettine 41 ($IC_{50} = 0,04 \mu M$) est qu'elle présente une efficacité d'inhibition supérieure aux deux autres inhibiteurs synthétiques l'INDY et FINDY ($IC_{50} = 0,24 \mu M$ et $0,11 \mu M$ respectivement). La caractérisation de la Leucettine 41 et de ses dérivés dans le modèle murin fera donc l'objet de cette thèse.

1.11. Le projet

On estime qu'environ 60 millions de personnes sont actuellement porteuses de T21 dans le monde, dont 50 000 en France. La déficience intellectuelle qui les touche est un des traits caractéristiques les plus handicapants pour la vie quotidienne de ces patients. Outre la caractérisation des altérations mnésiques associées au SD décrite dans les paragraphes précédents, une récente étude néerlandaise a suivi 123 enfants porteurs de T21, depuis leur très jeune âge jusqu'à l'âge de 10 ans, afin de déterminer le degré d'altération dans les fonctions d'adaptation qui contrôlent leur vie de tous les jours (Marchal et al., 2016). Les résultats ont montré que ces enfants présentaient une très bonne aptitude à la socialisation qui sous-entend les relations sociales et amicales ou encore leur participation aux activités de loisir. En revanche, ils possédaient de grandes difficultés dans les capacités de communication c'est à dire l'utilisation quotidienne du langage réceptif, expressif et écrit. Enfin, leur faculté à exercer les activités de la vie quotidienne ou à s'adapter aux différentes situations qu'impose le quotidien, était également fortement diminuée. Ces activités comprennent les tâches qui demandent une prise en charge de soi-même telles que se nourrir, faire sa toilette ou encore se vêtir. Il s'agit également de leur capacité à adopter un comportement vigilant face aux dangers potentiels, ou encore de comprendre la notion du temps et de l'argent. Grâce aux avancées de la médecine et aux progrès concernant la prise en charge des personnes atteintes de T21, leur espérance de vie a progressé jusqu'à l'âge de 60 ans de nos jours, période à laquelle apparaissent hélas les signes de démence qui viennent alors alourdir leur handicap d'origine.

Réussir à améliorer les performances intellectuelles des patients atteints de T21 représente donc un enjeu majeur pour leur permettre d'acquérir plus d'indépendance, une meilleure intégration sociale et ainsi, une qualité de vie améliorée pour eux-mêmes et pour leur famille.

Les données de la littérature décrites dans cette introduction ont clairement démontré l'implication de DYRK1A dans les déficiences cognitives associées à la T21 ainsi que l'effet bénéfique de son inhibition sur la correction des déficits de capacités mnésiques. Mon projet de thèse s'est inscrit dans la caractérisation d'inhibiteurs plus sélectifs de DYRK1A, les Leucettines, synthétisés et optimisés par la start-up de biotechnologie ManRos Therapeutics. Ces inhibiteurs ont été testés dans différents modèles trisomiques murins exprimant une seule copie surnuméraire de DYRK1A (*Tg(Dyrk1a)*), ou possédant également d'autres gènes homologues au chromosome 21 humain (*Ts65Dn* et *Dp1Yey*). La finalité de cette recherche est triple : (1) établir la preuve de concept que l'inhibition pharmacologique de DYRK1A

compense les déficits mnésiques liés à la T21, (2) permettre de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux altérations mnésiques dues au surdosage de DYRK1A, et (3) surtout, participer à l'identification et à la validation d'un candidat médicament capable d'améliorer les fonctions cognitives des patients atteints de Trisomie 21.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Les animaux

2.1.1. Hébergement

Les animaux sont manipulés sous l'agrément du comité d'éthique local (n°17) et sous accord du Ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche. Le Dr. Yann HERAULT possède donc l'accréditation pour les expérimentations de ce projet sous les numéros APAFIS #5331 et #3473. Pour tous les tests, les souris sont hébergées dans une animalerie exempte d'organismes pathogènes spécifiques. Elles bénéficient en outre d'un accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau. Enfin, l'éclairage en lumière artificielle est réalisée pendant 12h à partir de 7h du matin.

2.1.2. Géotypage des animaux

2.1.2.1. Digestion tissulaire et extraction d'ADN

Toutes les souris utilisées dans cette étude sont géotypées de la manière suivante: une biopsie de queue prélevée dans les dix jours suivant la naissance est digérée dans 100 µl de tampon de lyse (Viagen #102-T) supplémenté de 3 µl de Protéinase K à 10 µg/µl (Thermo Scientific, #EO0491). Les échantillons sont ensuite incubés à 56°C dans un bain-marie sur la nuit. Une fois les biopsies digérées, elles sont incubées à 88°C durant 1h afin d'inactiver les protéases. Enfin, les tubes sont centrifugés pendant 5 min à 13.000 rpm et le surnageant utilisé pour la réaction de PCR.

2.1.2.2. Amplification du fragment d'ADN d'intérêt par PCR

Entre 150 µg et 300 µg d'ADN sont mis en présence d'un tampon de réaction 1x (Roche, #10356000) et de 10 µM de dNTP, de 5 U/L de Taq polymérase (Roche, #14647428). Dix micromoles de chaque amorce servant à l'amplification des fragments d'ADN d'intérêt sont ajoutées. Ainsi, pour le géotypage des animaux transgéniques sur-exprimant DYRK1A, les Tg(*Dyrk1a*), les amorces suivantes ont été utilisées : Dyrk-L (TGG GCC AAG CAG TTA GGA GTT T) et Bac11-R (CCA TGA TTA CGC CAA GCT ATT TAG G) destinés à l'amplification des fragments d'ADN mutant, ainsi que Fez-L (GCT TCG GGA GCA GGT

ACC CTA T) et Fez-R (CAA GAT CTG AGG CTC GCC AAG T) destinés à l'amplification des fragments d'ADN sauvage. Pour le génotypage des souris Dp(16)1yey, il s'agit des amorces Yey-F (TAT TAG GAC AAG GCT GGT GG) et Yey-R (GTC AGT GGT TGT GAC TTG TG) qui sont nécessaires. Le mélange est complété avec de l'eau ultra-pure dans un volume final de 15 µl et la réaction est effectuée dans un thermo cycler. Les étapes de dénaturation de l'ADN, d'hybridation des amorces et d'élongation se déroulent comme suit selon les modèles :

Lignée Tg(*Dyrk1a*)

94°C	5 min	35 fois
94°C	30 s	
60°C	30 s	
68°C	1 min	
68°C	10 min	

Lignée Dp(16)1yey

95°C	2 min	35 fois
95°C	20 s	
60°C	20 s	
72°C	30 s	
72°C	7 min	

Ces trois étapes sont répétées 35 fois avant d'obtenir un minimum de 50 µg de copies de séquences d'ADN d'intérêt.

2.1.2.3. Electrophorèse sur gel d'agarose et révélation aux UV

La migration des produits de PCR s'effectue par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% en présence de 2 µl de BET (Euromedex #EU0070). Un minimum de 50 µg d'ADN supplémenté de tampon de charge est déposé sur gel et la migration conduite à 130 V pendant une demi-heure. Le gel est ensuite révélé sous ultra-violets. Ainsi, le fragment d'ADN correspondant aux souris Tg(*Dyrk1a*) est détecté à 230 pb, tandis que celui des souris sauvage l'est à 180 pb.

2.2. Traitement aux Leucettines

Chaque Leucettine (L41, L71 ou L3), réceptionnée sous forme de poudre, est mise en solution dans du DMSO à une concentration de 40 mg/ml, aliquotée et stockée à -20°C. La solution injectable est préparée extemporanément et est constituée de Leucettine/PEG300/NaCl 0.9%, 5/50/45 (v/v/v). La Leucettine est remplacée par du DMSO lors de la préparation de la solution véhicule. Le traitement est administré aux animaux de manière quotidienne, par voie intra-péritonéale (i.p), à une concentration de 20 mg Leucettines/kg. La durée du traitement dépend de l'étude menée : l'injection peut être unique lorsque l'on étudie la pharmacocinétique de la molécule par exemple, ou s'étendre sur 5, 12 à 19 jours lors de l'étude de la rémanence de l'effet de la drogue.

2.3. Tests de comportement: l'OPR (« Object Place Recognition ») et le NOR (« Novel Object Recognition »)

2.3.1. Phase d'habituation à l'expérimentateur

Quinze jours avant de passer les tests de comportement, les souris sont habituées à être manipulées, afin d'éviter tout stress provoqué par la présence de l'expérimentateur pouvant constituer un biais durant les tests. Ainsi, les gestes de préhension sont réalisées tous les jours pendant 2 minutes par souris.

2.3.2. Matériels

Les tests de comportement sont réalisés soit dans une bassine ronde blanche et opaque, de 53 cm de diamètre pour le NOR, soit dans une enceinte carrée gris clair et opaque de dimensions 44 x 44 x 38 cm pour l'OPR mais aussi le NOR. Cette dernière comporte une bande blanche traversant horizontalement une des parois de l'arène, faisant office de repère spatial. Chaque arène est placée dans une pièce d'expérimentation vidéo trackée, éclairée à 43 Lux et isolée de la salle de contrôle et des cages d'hébergement. Les objets utilisés sont une paire de

dés et de billes. L'arène et les objets sont nettoyés à l'alcool 50% après chaque passage de souris.

2.3.3. La reconnaissance de nouvel objet ou Novel Object Recognition (NOR)

Le test du NOR est basé sur la tendance naturelle des rongeurs à explorer plus intensément un objet qui leur paraît nouveau, par rapport à un objet qui leur est déjà familier. C'est la mémoire de reconnaissance qui est alors mesurée dans ce test.

Les deux premiers jours du test du NOR sont consacrés à une phase d'habituation à l'arène. Ainsi, chaque jour à tour de rôle, une souris est placée dans la bassine pour une durée de 15 minutes avant d'être remise dans sa cage d'hébergement. Le troisième jour constitue la phase de présentation des objets : une paire d'objet (dés ou billes) est alors disposée et fixée dans la bassine de manière équidistante des parois. Chaque souris est alors libre de prendre connaissance des objets pendant 10 minutes. Vingt quatre heures plus tard, au 4^{ème} jour du test, un des objets familiers de la veille est remplacé par un nouvel objet (dés ou billes). C'est pendant ces 10 minutes de test que l'on va alors mesurer le temps d'exploration de la souris pour chacun des objets. Le choix des objets ainsi que l'emplacement du nouvel objet à droite ou à gauche de l'objet familier, est randomisé par rapport au génotype et au traitement. A noter que ce test a également pu être réalisé suite au test de l'OPR décrit ci-après. Il se déroule alors le 5^{ème} jour, dans l'enceinte opaque carrée suivant le même protocole que pour la bassine blanche.

2.3.4. La reconnaissance du nouvel emplacement de l'objet ou Object Place Recognition (OPR)

Le test de l'OPR est basé sur la tendance naturelle des rongeurs à explorer plus longuement un objet qui aurait changé de place, par rapport à un objet identique qui n'a pas été déplacé. Ce test permet de mettre en évidence la mémoire spatiale chez la souris.

Comme précédemment, les souris sont d'abord sujettes à une phase d'habituation de 15 minutes sur les deux premiers jours du test. Le troisième jour, une paire d'objet (dés ou billes) est présentée à chaque souris pendant 10 minutes. Dans l'enceinte, les objets sont disposés de la manière suivante : un des deux items est fixé à droite ou à gauche de la bande blanche, à 6 cm du bord de la paroi où se trouve cette dernière. L'autre objet identique est placé de manière centrée à 6 cm du mur opposé à celui du repère spatial. Après 24h de rétention, l'item situé du côté du mur opposé au repère spatial est ramené à gauche ou à droite de la bande blanche, à équidistance de celle-ci avec l'objet qui n'a pas été déplacé. Le choix de la paire d'objets et l'emplacement à gauche ou à droite du repère spatial est défini de façon randomisée par rapport au génotype et au traitement.

2.3.5. Traitement des données et analyses statistiques

Chaque test est réalisé en aveugle pour le génotype et le traitement. Les souris n'ayant pas exploré plus de 3 secondes les objets lors de la présentation ou du test sont exclues de l'étude. L'acquisition des données est effectuée par le logiciel EthoVision XT, et les analyses statistiques par GraphPad Prism (two-way ANOVA, Tuckey post-hoc).

2.4. Pharmacocinétique et biodistribution de la L41 : préparation des échantillons

La pharmacocinétique et la biodistribution de la L41 dans des animaux sauvages, ont été étudiées à différents temps après administration unique de 20 mg L41/kg par voie intrapéritonéale: 10 mn, 20 mn, 30 mn, 60 mn, 2 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h, 96 h, 192 h. Après chaque temps (n=3 souris par point), les animaux ont reçu une surdose de pentobarbital et le sang a été

prélevé par voie rétro-orbitale. Les cerveaux ont été perfusés avec du PBS pour ôter le sang résiduel, puis prélevés, cryocongelés, et enfin confiés à la société TechMed pour le dosage de la L41 dans le plasma et le cerveau.

2.5. Etude phosphoprotéomique : l'analyse des données

L'hippocampe, le cortex et le cervelet des animaux Tg(*Dyrk1a*) et Ts65Dn âgés de 3 mois ainsi que leurs contrôles respectifs, traités ou non à la L41 (20 mg/kg) pendant 19 jours en i.p, ont été prélevés, cryocongelés et envoyés à nos collaborateurs les Dr. Spiros Garbis et Dr. Antigoni Manousopoulou (Université de Southampton, UK) pour l'analyse du phosphoprotéome. Les substrats potentiels directs de DYRK1A ont pu être identifiés dans le phosphoprotéome en utilisant le motif consensus de phosphorylation de DYRK1A, à savoir R-P-x(1,3)-S/T-P. Les données générées ont été soumises à un premier classement selon leur fonctions biologiques à l'aide de l'application ToppCluster (Correction Bonferroni, p-value cutoff 0,05). Ce classement prenait en compte les phospho-protéines dont la phosphorylation était augmentée ou diminuée dans les deux modèles de T21, mais aussi inversement modulées par le traitement à la L41. De plus, seuls les processus biologiques communs aux trois régions du cerveau et aux deux modèles ont été représentés. Quant aux interactions protéine-protéine, elles ont été identifiées avec l'outil STRING. Enfin, la représentation graphique en réseau a été effectuée avec le logiciel Cytoscape.

2.6. Fractionnement subcellulaire

2.6.1. Isolation de la fraction nucléaire

L'isolation de la fraction nucléaire a été réalisée à partir de cerveaux entiers de souris sauvages âgées de 3 mois. Les tissus ont été dissociés à l'aide du kit ProteoExtract Tissue Dissociation Buffer kit (CalbioChem #539720). Le cerveau est tout d'abord déchiqueté dans 10 ml de tampon de lyse constitué de Buffer 10x dilué dans de l'eau pure supplémenté de trypsin 0,25% (1 ml / 100 g de tissu). Une fois le cerveau réduit en petits morceaux, celui-ci est mis à agiter sous rotation douce à 37°C dans le même tampon de lyse pendant 50 min. Le mélange

est ensuite reflué une dizaine de fois à l'aide d'une seringue stérile 23G. Puis le lysat est filtré à travers un tamis cellulaire de 70 μm et $3\text{-}5 \times 10^6$ cellules sont centrifugées à 4°C pendant 5 min à 1.800 rpm. Le culot est alors resuspendu dans 5 ml d'une solution de lavage contenant du Buffer 10x dilué dans de l'eau pure et additionné d'inhibiteurs de protéases fournis dans le kit. L'ensemble est à nouveau centrifugé à 4°C pendant 5 min à 1.800 rpm. L'enrichissement de la fraction nucléaire à partir du culot est réalisé grâce au kit ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction kit (CalbioChem #539790). Les échantillons sont maintenus à 4°C tout au long du protocole suivant. Le culot est repris dans 2 ml de tampon de lavage approprié, et la suspension est centrifugée pendant 10 min à 300 rcf. Cette étape de lavage est répétée 2 fois. Puis, le culot est doucement resuspendu dans 500 μl de Buffer I additionné de 2,5 μl d'inhibiteurs de protéases du kit. Le mélange est ensuite incubé pendant 10 min sous rotation douce puis centrifugé pendant 10 min à 1000 rcf. Le surnageant transféré dans un nouveau tube constitue la fraction cytosolique. Le culot restant est à nouveau repris dans 500 μl de Buffer II en présence de 2,5 μl d'inhibiteurs de protéases avant d'être incubé sous rotation douce pendant 30 min. Puis l'échantillon est centrifugé à 6.000 rcf durant 10 min et le surnageant est récupéré dans un nouveau tube correspondant aux membranes et organelles. Quant au culot, il est resuspendu dans 250 μl de Buffer III additionné de 2,5 μl d'inhibiteurs de protéases ainsi que de 0,75 μl de benzonase. Le mélange est soumis à une agitation douce pendant 10 min avant d'être centrifugé à 7.000 rcf pendant 10 min. Le surnageant récolté représente la fraction nucléaire. Enfin, le dernier culot est repris dans 250 μl de Buffer IV additionné de 2,5 μl d'inhibiteurs de protéases et constitue la partie cytosquelettique. Durant cette étude, les fractions représentant les membranes et organelles ainsi que le cytosquelette ne contenaient pas assez de protéines pour permettre la détection des protéines d'intérêt par western blot. Ainsi, ces 2 fractions ont été rassemblées avec le compartiment cytosolique pour obtenir finalement une fraction nucléaire isolée du reste de la cellule.

2.6.2. Isolation de la fraction synaptosomale

L'enrichissement en synaptosomes a été réalisé à partir de cerveaux entiers de souris sauvages âgées de 3 mois, à l'aide du kit Syn-PER Synaptic Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, #87793). L'échantillon est tout d'abord lysé mécaniquement avec un homogénéisateur de type Potter dans 2 ml de Syn-PER Reagent additionné d'inhibiteurs de protéases (Roche, #11873580001). Après une dizaine d'aller-retour au Potter, le lysat est

transféré dans un tube 2 ml et centrifugé à 4°C pendant 10 min à 1 200 rcf. Cinq cent microlitres sont ensuite mis de côté, qui correspondent à l'homogénat servant de contrôle positif lors de la future vérification de la purification des fractions subcellulaires par western blot. Le reste du tissu lysé est récupéré dans un autre tube 1,5 ml et soumis à une nouvelle centrifugation à 4°C pendant 20 min à 15.000 rcf. Le surnageant est alors transféré dans un nouveau tube eppendorf, il correspond à la fraction cytosolique. Le culot constituant la fraction des synaptosomes, est repris dans 250 µl de Syn-PER Reagent avec les inhibiteurs de protéases.

2.6.3. Confirmation de la purification des fractions par western blot et quantification de l'expression de DYRK1A.

La purification des fractions a été confirmée par immuno-détection des protéines spécifiques de chaque compartiment subcellulaire grâce à la technique du western blot. Ainsi, les échantillons sont mis en présence d'un tampon de charge contenant l'agent réducteur DTT (ThermoFisher #39000) puis dénaturés à 95°C pendant 5 min. Vingt microgrammes de chaque fraction ainsi que de l'homogénat sont ensuite déposés sur gel d'acrylamide 10% SDS-PAGE. La migration s'effectue sous électrophorèse à 55V pendant 2h30 dans un tampon de migration composé de Tris-Glycine-SDS [25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0,1% SDS]. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose sous l'effet d'un courant électrique de 110V pendant 1h30 dans le même tampon additionné de 20% d'éthanol pur. Après transfert, les membranes sont saturées avec du lait en poudre 5% pendant 1h30 à température ambiante avant d'être incubées à 4°C pendant la nuit avec les anticorps suivants : DYRK1A (Abnova #H00001859-M01, 1 :1000), H2B (produit au service de production d'anticorps de l'IGBMC, 1:1000), PSD95 (Abcam #ab18258, 1:1000), GLUR1 (Millipore #ab1504, 1:1000), SYNAPSIN1 (Abcam #ab64581, 1:1500), CYCLIN L1 (produit au service de la production d'anticorps à l'IGBMC, 1:700), β -ACTIN (Sigma #A3854, 1:100.000). Les membranes sont ensuite lavées pendant 3 x 5 min avec une solution de TBS-Tween 0,1%, puis sont incubées avec un anticorps secondaires anti-lapin (Molecular probes #A16096, 1:5000) ou anti-souris (Dako #P0448, 1:5000) couplé à l'HRP à température ambiante pendant 1h. Enfin, les membranes sont à nouveau lavées au TBS-Tween 0,1% pour 3 x 5 min et les protéines révélées par chimiluminescence à l'aide du kit Clarity® Western ECL Substrate (BioRad #170-5061). Les photos sont acquises avec l'imageur Amersham Imager 600 et la densité du signal mesurée dans ImageJ.

2.7. Co-immunoprécipitation

2.7.1. Extraction des protéines

Les protéines sont extraites à partir de demi-cerveaux frais de souris sauvages âgées de 3 mois à l'aide de tubes à lyse Precellys® dans 1.2 ml de solution RIPA supplémentées d'inhibiteurs de protéases, de 2.4 mM de sodium orthovanadate et de 4.8 mM de PMSF (Santa Cruz sc-24948A). Après un broyage mécanique à 5.000 rpm pendant 2 x 15 sec, les échantillons sont centrifugés à 4°C pendant 30 min à 14.000 rpm, puis 1 ml de surnageant est récolté dans un nouveau tube.

2.7.2. Co-immunoprécipitation des protéines d'intérêt

Deux microgrammes d'anticorps anti-DYRK1A (Abnova #H00001859-M01), anti-KIF2A (Abcam #ab37005), anti-NMDAR2B (Abcam, #ab65783), anti-PSD95 (Abcam, #ab18258) ou anti-SYNAPSIN1 (Abcam #ab64581) sont ajoutés à l'extrait protéique qui est ensuite incubé à 4°C pendant 1 h sous rotation lente. Un aliquot du reste de surnageant est mis de côté pour être utilisé comme contrôle de l'homogénat dans les futurs western blots. Pendant ce temps, 20 µl de billes de protéine G -agarose sont rincés trois fois avec une solution de lavage (50 mM Tris (pH 7.4), 5 mM NaF, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 0.1% Nonidet P-40 et cocktail d'inhibiteur de protéases 25X (Roche #11873580001)). Les billes sont ensuite ajoutées au lysat et incubées sous rotation douce pendant 30 min à 4°C. Après une brève centrifugation à 10 000 rcf pendant 1 min, le surnageant est retiré, et l'immuno-précipitat est lavé 3 fois avec la solution de lavage puis repris dans 150 µl de cette solution avant l'analyse par western blot.

2.7.3. Mise en évidence par western blot

La protéine immuno-précipitée ainsi que les protéines complexées sont ensuite mises en évidence par western blot. Ainsi, 50 µl d'échantillon d'immunoprécipitation ainsi que 20 µg d'homogénat sont déposés sur le gel. Les anticorps anti-DYRK1A (Abnova #H00001859-M01, 1:1000), anti-KIF2A (Abcam #ab37005, 1:10 000), anti-NMDAR2B (Abcam #ab65783, 1:500), anti-PSD95 (Abcam #ab18258, 1:1000), anti-SYNAPSIN1 (Abcam #ab64581,

1:1000), anti-CAMK2A (Thermo Fisher #PA5-14315, 1:1000), anti-SYNGAP (Santa Cruz #sc-33598, 1:500) and anti-GAPDH (Thermo Fisher #MA5-15738 1:3000) ont été utilisés pour l'hybridation.

2.8. Mesure de l'activité kinase

2.8.1. Immunoprécipitation des kinases

Les protéines issues de demi-cerveaux cryocongelés des animaux d'intérêt sont dans un premier temps extraites dans le tampon de lyse suivant : 60 mM β -glycérophosphate, 15 mM p-nitrophenylphosphate, 25 mM Mops (pH 7,2), 15 mM EGTA, 15 mM MgCl₂, 2 mM dithiothreitol, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride, 1 mM phenylphosphate disodium et des inhibiteurs de protéases (Roche, #11873580001). Les protéines sont ensuite dosées avec le kit Pierce BCA protein assay (Thermo Fisher #23225). Ainsi pour chaque série de dosage, la même quantité de protéines est utilisée pour immunoprécipiter la kinase d'intérêt. L'immunoprécipitation est réalisée suivant le protocole 2.7.2 en utilisant 0,8 μ g d'anticorps anti-DYRK1A (H00001859-M01). Une fois la protéine DYRK1A immunoprécipitée, le surnageant est récupéré pour procéder à l'immunoprécipitation de GSK3 β en l'incubant avec 0,8 μ g d'anticorps anti-GSK3 β (MBS8508391). Tous les culots contenant les protéines immunoprécipitées sont repris dans 22,5 μ l de tampon C (60 mM β -glycérophosphate, 30 mM p-nitrophenylphosphate, 25 mM MOPS (pH 7,2), 5 mM EGTA, 15 mM MgCl₂, 2 mM dithiothreitol, 0,1 mM sodium orthovanadate, 1 mM phenylphosphate).

2.8.2. Mesure d'activité kinase par radioactivité

Une fois DYRK1A et GSK3 β immunoprécipitées, l'activité catalytique de ces kinases est estimée par un dosage radioactif. Pour cela, DYRK1A est incubé avec 2,5 μ l de peptide substrat Woodtide KKISGRLSPIMTEQ (0,98 mM / essai) en présence de 15 μ M d'ATP et de (γ -³³P) ATP (0,36 μ Ci / essai) dans un volume final de 30 μ L. La réaction commence par l'ajout des 5 μ l du mélange ATP + (γ -³³P)-ATP. Les tubes sont incubés dans un bain-marie à 30°C et agités régulièrement toutes les 2 minutes. Après 30 minutes d'incubation, les tubes sont centrifugés brièvement pendant 10 sec à 10.000 rpm. Vingt-cinq microlitres de la réaction sont

alors transférés sur une membrane de phosphocellulose (Perkin Elmer #1450-421). Après une succession de 3 lavages pendant 5 min dans de l'acide phosphorique à 1%, les membranes sont déposées dans des tubes de comptage auxquels sont ajoutés 2 ml de liquide de scintillation. La radioactivité absorbée sur les filtres de phosphocellulose est mesurée pendant 1 min par échantillon dans un compteur à scintillation (Beckman Coulter). Elle reflète l'incorporation de γ - ^{33}P dans les substrats et donc l'activité catalytique des kinases. La même procédure est réalisée pour doser la GSK3 β dont le peptide substrat est YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQSEDEEE.

Pour l'étude de la phosphorylation de la protéine SYNAPSINE 1, KIF2A et NR2B, le même protocole a été utilisé en utilisant 50 ng de protéine DYRK1A recombinante (Thermo Fisher #PV3785) et 0,98 mM des peptides suivants :

SYN-1-tide RQSRPVAGGPGAPPAARPPASPSPQRQ,

SYN-1-S551A RQSRPVAGGPGAPPAARPPAASPQRQ,

SYN-1-S553A RQSRPVAGGPGAPPAARPPASPPAPQRQ.

KIF2A-tide SQGGGSRPDLSPSYDYDD FS

N2RB-tide KNRNKLRRQHSYDTFVDLQK

2.9. Comptage vésiculaire en microscopie électronique à transmission

2.9.1. Préparation des échantillons

Les cerveaux des souris Tg(*Dyrk1a*) traitées (n=3) ou non à la L41 (20mg/kg) (n=3) pendant 19 jours en i.p ainsi que les contrôles respectifs (n=3) ont été perfusés au PBS puis au PFA 4%. Les cerveaux prélevés ont ensuite été fixés dans un bain de PFA 2,5% et glutaraldéhyde 2,5% dilués dans une solution de cacodylate à 0,1 M, pH 7.4. Les échantillons sont à nouveau fixés dans 1% de tetroxide d'osmium dilué dans 0,1 M d'une solution de cacodylate pendant 1 h à 4°C puis incubés dans 5% d'acétate d'uranyle pendant 2h à 4°C. Puis ils sont déshydratés par une succession de bains d'alcool (50, 70, 90 et 100%) additionnés d'oxide de propylène, pendant 30 min. Après inclusion dans de l'Epon 812, des coupes semi-

finies frontales de 2 μ m sont réalisées, suivies de coupes ultra-fines de 70 nm. Les coupes sont ensuite contrastées avec de l'acétate d'uranyle et observées en microscopie électronique à transmission Morgagni 268D.

2.9.2. Prise d'images et quantification

Les images des vésicules présynaptiques ont été obtenues à un grossissement de 31.000 X. Environ 100 images par condition de génotype et de traitement ont été nécessaires pour permettre l'analyse statistique. Seules les coupes des neurones myélinisés ont été retenues. De plus, les boutons terminaux présynaptiques présentant plusieurs jonctions post-synaptiques ont été exclues de l'analyse. Les vésicules ont été directement comptées sur les photographies et leur densité exprimée en nombre de vésicules par μm^2 en divisant ce nombre par l'aire du bouton présynaptique. Le comptage et la mesure de l'aire de la partie terminale a été réalisé avec le logiciel Image J.

3. RESULTATS

A. Mode d'action de la L41

Le premier objectif de ce projet a été de caractériser le mode d'action de la L41. Ainsi, j'ai étudié **(1)** sa pharmacocinétique et sa bio-distribution par voie intra-péritonéale, **(2)** son effet chez différents modèles murins mâles et femelles trisomiques dans les tests de l'OPR et du NOR suite à un traitement de 19 jours mais également **(3)** pour des durées plus courtes, **(4)** la rémanence de son effet sur l'activité catalytique de DYRK1A et sur les performances mnésiques des souris trisomiques 24 h et 48 h après l'arrêt d'un traitement de 19 jours, **(5)** son effet sur l'activité kinase de DYRK1A en fonction de la dose, et enfin, **(6)** sa distribution subcellulaire.

3.1. Pharmacocinétique et biodistribution de la L41 suite à une injection intra-péritonéale

La pharmacocinétique et la bio-distribution de la L41 a été établie suite à une injection par voie intrapéritonéale de 20 mg de L41 /kg dans des animaux sauvages (n=3) et transgéniques (n=3). Les résultats montrent que la demi-vie plasmatique de la molécule est d'environ 45 minutes. La L41 traverse la barrière hémato-encéphalique, atteint sa concentration maximale (0,23 nmol / cerveau) dans le cerveau 20 minutes après l'injection et disparaît complètement de la circulation sanguine et du cerveau après 24 h (**Figure 10**). Aucune différence dans la pharmacocinétique ni dans la bio-distribution de la drogue n'a été observée entre les animaux transgéniques et les contrôles sauvages.

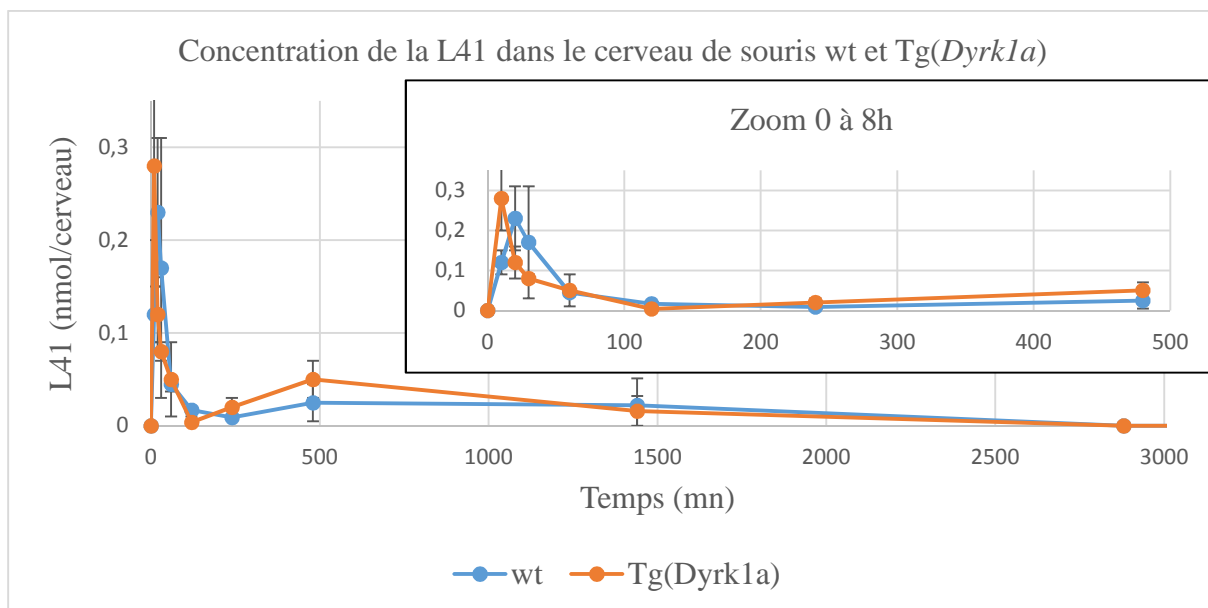
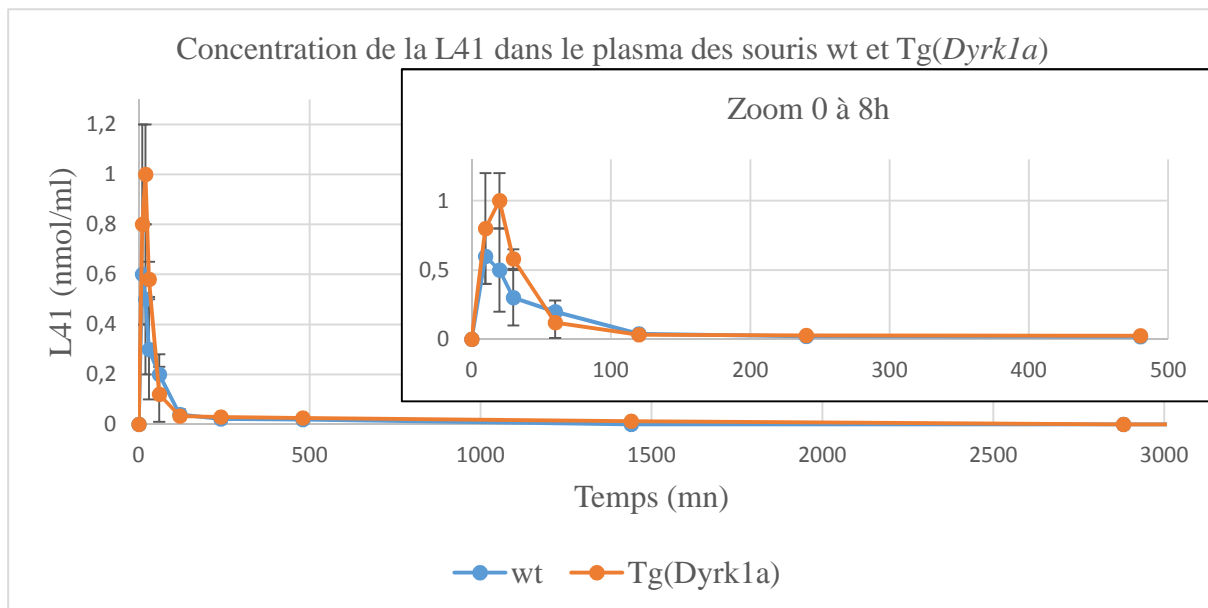


Figure 10. Concentration de la L41 dans le plasma et dans le cerveau des animaux sauvages (wt) et Tg(*Dyrk1a*).

3.2. Effet de différentes Leucettines dans les tests de l'OPR et du NOR dans plusieurs modèles murins de la T21

Avant le début de ma thèse, la preuve de concept avait déjà commencée à être établie dans le test du NOR avec une des Leucettines, la L41, dans les modèles murins Tg(*Dyrk1a*) et Ts65Dn, par le Dr. Arnaud Duchon. A mon arrivée dans le laboratoire, j'ai pu poursuivre l'étude sur les Tg(*Dyrk1a*) dans le test du NOR mais également dans l'OPR. En revanche, faute de disponibilité des souris, je n'ai pu réitérer les tests concernant les Ts65Dn. Ainsi, pour une meilleure compréhension des résultats qui vont suivre, les données associées aux Ts65Dn obtenues avant le début de ce projet ont tout de même été intégrées.

3.2.1. Effet de la L41 dans le test de l'OPR chez les mâles et femelles Tg(*Dyrk1a*)

La mémoire spatiale a été mesurée avec le test de l'OPR dans les souris sauvages et Tg(*Dyrk1a*) traitées (T) ou non traitées (NT) à la L41 (20 mg / kg) pendant 19 jours en i.p. (**Figure 11**). Le temps passé sur l'objet déplacé (Do) et celui sur l'objet familier non déplacé (Fo) pour chaque groupe d'animaux sauvages traités (wt T, n = 15 pour les mâles ; n = 15 pour les femelles) et non traités à la L41 (wt NT, n = 17 pour les mâles, n = 13 pour les femelles), et transgéniques traités (Tg T, n = 10 pour les mâles ; n = 14 pour les femelles) et non traités à la L41 (Tg NT, n = 10 pour les mâles ; n = 15 pour les femelles) a été calculé et représenté en pourcentage d'exploration. Les animaux mâles et femelles wt NT (40% Fo et 60% Do, p = 0.003 pour les mâles ; 45% Fo et 55% Do, p = 0.03 pour les femelles) et T (41% Fo et 59% Do, p = 0.02 pour les mâles ; 36% Fo et 67% Do, p = 0.003 pour les femelles) explorent significativement davantage l'objet déplacé que l'objet familier, indiquant que la mémoire pour l'objet non déplacé est bien présent. Au contraire, les Tg NT passent autant de temps sur chacun des objets (47% Fo et 53% Do p = 0.62 pour les mâles ; 52% Fo et 48% Do, p = 0.31 pour les femelles), suggérant un déficit de la mémoire spatiale. Ce défaut ne semble pas être corrigé chez les souris mâles ou femelles Tg T (54% Fo et 46% Do, p = 0.11 pour les mâles ; 47% Fo et 53% Do, p = 0.48 pour les femelles).

La L41 n'a donc pas d'effet sur la mémoire spatiale chez les souris Tg(*Dyrk1a*).

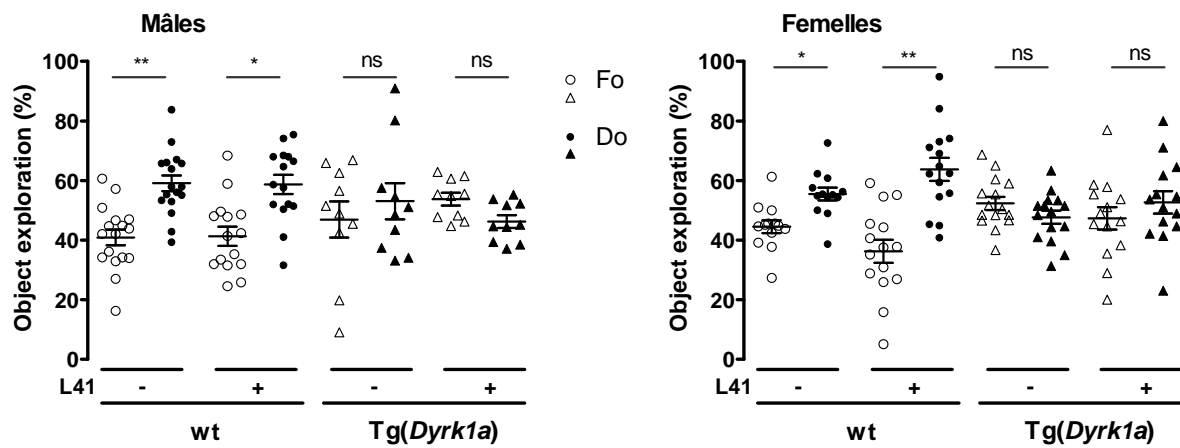


Figure 11. Effet de la L41 sur la mémoire spatiale des souris *Tg(Dyrk1a)* mesurée dans le test de l'OPR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns non significatif.

3.2.2. Effet de la L41 dans le test du NOR chez les mâles et femelles *Tg(Dyrk1a)*

Après un traitement quotidien de 19 jours à la L41 (20 mg/ kg) ou au véhicule, les souris wt NT (n = 16 pour les mâles ; n = 12 pour les femelles), wt T (n = 15 pour les mâles ; n = 15 pour les femelles), Tg NT (n = 9 pour les mâles ; n = 15 pour les femelles) et Tg T (n = 10 pour les mâles ; n = 15 pour les femelles) ont passé le test du NOR permettant la mesure de leur mémoire de reconnaissance (**Figure 12**). A noter qu'une dernière administration est effectuée une demi-heure avant le début du test. Ainsi, le temps passé à explorer le nouvel objet (No) et l'objet familier (Fo) a été calculé et est représenté ci-dessous en pourcentage du temps d'exploration. Les résultats montrent que les souris mâles et femelles wt NT (34% Fo et 66% No, $p = 2.10^{-8}$ pour les mâles ; 41% Fo et 59% No, $p = 0.04$ pour les femelles) et wt T (32% Fo et 68% No, $p = 1.10^{-7}$ pour les mâles ; 35% Fo et 65% No, $p = 4.10^{-4}$ pour les femelles) sont capables de reconnaître le nouvel objet par rapport à l'objet familier. Ce qui n'est pas le cas des Tg NT qui montrent un déficit significatif dans leur mémoire de reconnaissance (49% Fo et 51% No, $p = 0.43$ pour les mâles ; 47% Fo et 53% No, $p = 0.31$ pour les femelles). En revanche, les Tg T, traitées avec l'inhibiteur de DYRK1A, réussissent à différencier le nouvel objet de l'ancien (38% Fo et 62% No, $p = 0.003$ pour les mâles ; 38% Fo et 62% No, $p = 0.001$ pour les femelles).

Ces résultats démontrent que la L41 restaure la mémoire de reconnaissance chez le modèle murin *Tg(Dyrk1a)*.

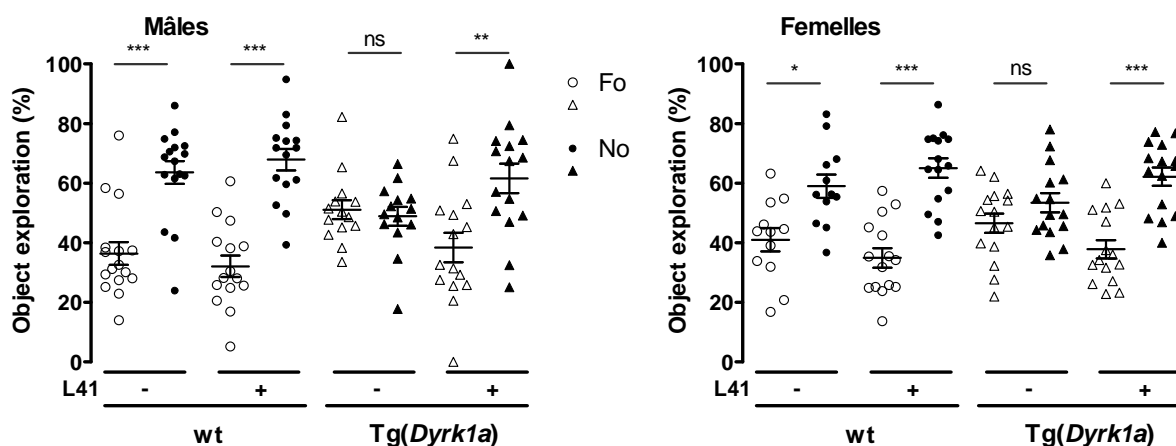


Figure 12. Effet de la L41 sur la mémoire de reconnaissance des animaux *Tg(Dyrk1a)* mesurée dans le test du NOR. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns non significatif.

3.2.3. Effet de la L41 dans le test du NOR chez un premier modèle plus complexe de T21 : les Ts65Dn

L'effet de la L41 a été étudié dans un premier modèle plus complexe de la T21, les Ts65Dn (Ts) et dans les souris contrôles correspondantes. La mémoire de reconnaissance des animaux wt NT (n = 10), wt T (n = 8), Ts NT (n = 9) et Ts T (n = 11) a ainsi été mesurée dans le test du NOR suite à une administration quotidienne pendant 19 jours, en i.p., de L41 (20 mg/kg) (**Figure 13**). Trente minutes avant le test, les souris ont subi une dernière injection. Comme indiqué sur le graphe ci-dessous, les souris wt NT (38% Fo et 62% No, $p = 0.003$) et wt T (39% Fo et 61% No, $p = 0.005$) montrent bien une préférence pour le No que pour le Fo. Les Ts NT (43% Fo et 57% No, $p = 0.08$) sont déficitaires dans ce test puisqu'elles ne discriminent pas les deux objets. En revanche, les Ts T (39% Fo et 61% No, $p = 0.01$) passent plus de temps à explorer le No que le Fo, suggérant que le souvenir de l'ancien objet a été préservé.

Ceci indique que la L41 est également capable de corriger significativement la mémoire de reconnaissance dans ce test du NOR chez un modèle murin de T21 plus complexe, le Ts65Dn.

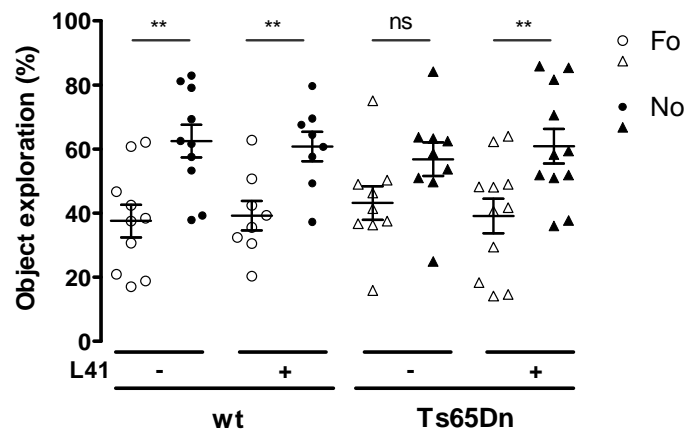


Figure 13. Effet de la L41 sur la mémoire de reconnaissance des souris Ts65Dn dans le test du NOR. ** $p < 0.01$, ns non significatif. (Réalisé par le Dr. Duchon A.)

3.2.4. Effet de la L41 dans le test du NOR chez un second modèle plus complexe de T21 : les Dp1yey

L'effet de la L41 sur la correction mnésique a également été testé chez un autre modèle plus complexe de T21, les Dp1yey (Dp) (**Figure 14**). Ainsi, suite à un traitement chronique par la L41 (20 mg /kg), ou véhicule, la mémoire de reconnaissance des animaux wt NT (n = 13), wt T (n = 16), Dp NT (n = 8) et Dp T (n = 11), a été évaluée dans le test du NOR comme décrit précédemment. Les souris wt NT et wt T répondent bien au test puisqu'elles explorent davantage le No que le Fo (38% Fo et 62% No, $p = 0.04$ pour les NT ; 40% Fo et 60% No, $p = 0.03$ pour les T). Au contraire les Dp NT en sont incapables (52% Fo et 48% No, $p = 0.76$). En revanche, les souris Dp T, donc traitées à la L41, parviennent à distinguer significativement le No du Fo (37% Fo et 63% No, $p = 0.03$).

La L41 permet donc également de corriger la mémoire de reconnaissance chez un autre modèle murin plus complet de la T21, les Dp1yey.

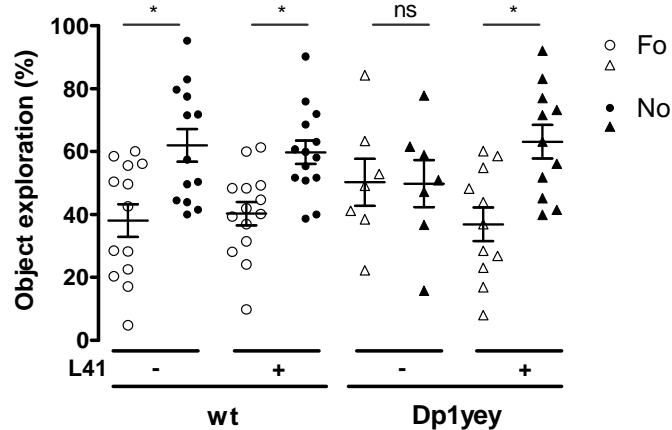


Figure 14. Effet de la L41 sur la mémoire de reconnaissance des souris Dp1yey mesurée dans le test du NOR. * $p < 0.05$, ns non significatif.

3.2.5. Effet de la L71 et de la L3, deux dérivés de la L41 dans le test du NOR chez les Tg(*Dyrk1a*)

Afin d'identifier d'autres cibles potentielles de la L41 et notamment parmi les récepteurs membranaires, ManRos Therapeutics a procédé à un criblage de la molécule sur plus de 300 protéines GPCR (résultats non montrés) et a pu montrer que la L41 pouvait interagir avec les récepteurs 1 aux cannabinoïdes, CB1. Il fallait donc démontrer que l'effet bénéfique de la drogue sur la mémoire de reconnaissance des animaux trisomiques n'impliquait pas l'interaction de la drogue avec les récepteurs CB1. En d'autres termes, il fallait vérifier que la correction mnésique par la L41 provenait de la seule inhibition de l'activité catalytique de DYRK1A. Pour ce faire, ManRos Therapeutics a fait synthétiser deux Leucettines, la Leucettine L3, un inhibiteur spécifique de CB1 n'ayant aucun effet sur DYRK1A, et la Leucettine 71, qui inhibe spécifiquement DYRK1A sans interagir avec CB1. Ces deux Leucettines et le véhicule correspondant ont donc été administrés à deux cohortes différentes de souris wt et Tg, quotidiennement pendant 19 jours, par voie intrapéritonéale, afin d'évaluer leurs effets sur la mémoire de reconnaissance dans le test du NOR (**Figure 15**): wt NT (n = 12 pour la L3 ; n = 10 pour la L71), wt T (n = 7 pour la L3 ; n = 12 pour la L71), Tg NT (n = 13 pour la L3 ; n = 12 pour la L71) et Tg T (n = 12 pour la L3 ; n = 9 pour la L71). Dans les deux cohortes, les wt NT reconnaissent bien le No du Fo (43% Fo et 57% No, $p = 0.008$ pour la cohorte L3 ; 43% Fo et 57% No, $p = 0.009$ pour la cohorte L71), comme les wt T, traitées avec la L71 (43% Fo et 57% No, $p = 0.007$). Par contre, le traitement à la L3 altère la mémoire de reconnaissance des wt T (50% Fo et 50% No, $p = 0.97$). En effet, les récepteurs CB1 sont connus pour moduler le relargage des neurotransmetteurs dans diverses régions cérébrales telles que l'hippocampe ou encore le cortex préfrontal. Ils contrôlent donc les processus de mémorisation et de cognition, ou encore la régulation de l'humeur (Freund et al., 2003; Wilson and Nicoll, 2002). Ainsi, une interaction anormale avec les récepteurs CB1 dérégulerait de manière dramatique la signalisation synaptique entraînant alors des défauts comportementaux. Quant aux souris Tg NT des deux groupes, elles présentent bien une altération cognitive puisqu'elles ne discriminent pas le No du Fo (50% Fo et 50% No, $p = 0.90$ pour la cohorte L3 ; 43% Fo et 57% No, $p = 0.08$ pour la cohorte L71). Les Tg T, traitées avec la L3, sont également incapables de différencier les deux objets (50% Fo et 50% No, $p = 0.71$). En revanche, les Tg T, traitées avec la L71, explorent significativement davantage le No que le Fo (39% Fo et 61% No, $p = 0.01$).

Ces résultats écartent donc l'implication des récepteurs CB1 dans la correction mnésique des animaux transgéniques traités avec la L41 observée dans le test du NOR. La restauration des capacités cognitives des modèles murins de T21 est bien due à l'inhibition spécifique de l'activité catalytique de DYRK1A.

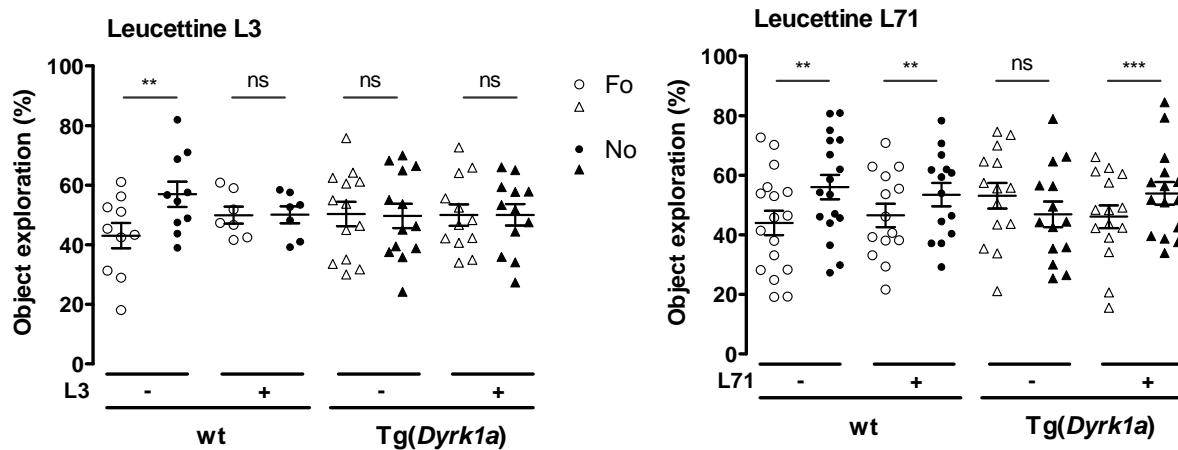


Figure 15. Effet de la L3 et de la L71 sur la mémoire de reconnaissance des souris Tg(*Dyrk1a*) dans le test du NOR. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns non significatif.

3.3. Effet de durées de traitement plus courtes, dans le test du NOR chez les Tg(*Dyrk1a*)

Afin de mieux caractériser le mode d'action de la L41, son effet sur la correction des performances intellectuelles des souris trisomiques a été étudié après des durées de traitement plus court, à savoir après 5 et 12 jours de traitement quotidien.

3.3.1. Effet de la L41 après 5 jours de traitement dans le test du NOR chez les souris Tg(*Dyrk1a*)

Une cohorte de Tg(*Dyrk1a*) et contrôles a été traitée par la L41 (20 mg/kg) et le véhicule en i.p. quotidiennement pendant 5 jours. A la fin du traitement, les souris wt NT (n = 15), wt T

(n = 15), Tg NT (n = 11) et Tg T (n = 13) ont passé le test du NOR (**Figure 16**). Comme attendu, les wt NT (37% Fo et 63% No, $p = 2.10^{-5}$) et les wt T (37% Fo et 63% No, $p = 2.10^{-4}$) différencient bien le No du Fo. Ce qui n'est pas le cas pour les Tg NT (51% Fo et 49% No, $p = 0.76$). En ce qui concerne le groupe des TG T, l'effet de correction de la L41 est à peine détectable (45% Fo et 55% No, $p = 0.03$) et reste bien inférieur à celui observé lors d'un traitement de 19 jours.

La durée de 5 jours d'administration de L41 reste donc insuffisante afin d'obtenir une restauration mnésique totale chez les souris transgéniques.

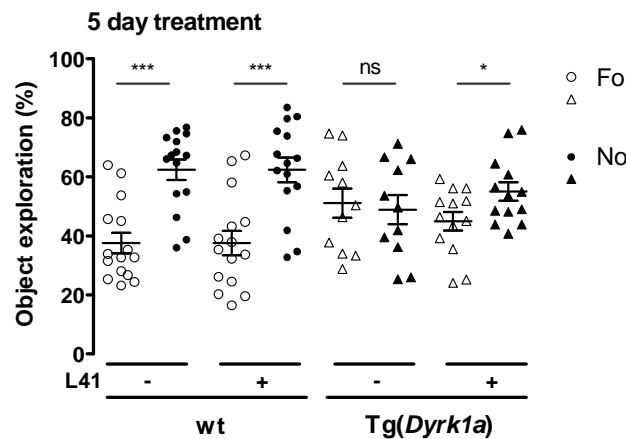


Figure 16. Effet de la L41 sur la mémoire de reconnaissance des animaux Tg(*Dyrk1a*) après 5 jours de traitement. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ns non significatif.

3.3.2. Effet de la L41 après 12 jours de traitement dans le test du NOR chez les souris Tg(*Dyrk1a*)

La même expérience a été répétée avec un traitement par la L41 (20mg /kg) ou véhicule, d'une durée de 12 jours consécutifs en i.p., dans les souris wt NT (n = 12), wt T (n = 14), Tg NT (n = 8) et Tg T (n = 11) (Figure 17). A nouveau, les wt NT (41% Fo et 60% No, $p = 2.10^{-4}$) et wt T (45% Fo et 55% No, $p = 0.01$) répondent correctement au test du NOR. On retrouve bien le déficit cognitif chez les Tg NT (49% Fo et 51% No, $p = 0.79$). Par contre, la mémoire de reconnaissance des animaux Tg T est significativement corrigée (37% Fo et 63% No, $p = 4.10^{-4}$), atteignant le même niveau que les wt dans ce test et que les Tg T pendant 19 jours.

Une administration d'une durée de 12 jours semble donc suffisante pour corriger les déficits cognitifs des souris transgénique, et atteindre, dans le test du NOR, des capacités cognitives similaires à celles des souris sauvages.

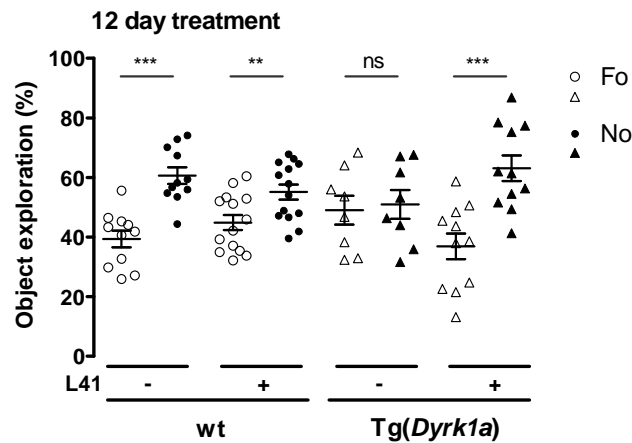


Figure 17. Effet de la L41 sur la mémoire de reconnaissance des souris Tg(*Dyrk1a*) après 12 jours d'administration. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns non significatif.

3.4. Rémanence de l'effet de la L41 sur l'activité kinase de DYRK1A et dans le test du NOR après l'arrêt d'un traitement de 19 jours

Toujours dans l'optique de mieux comprendre le mode d'action de la L41, la rémanence de son effet sur l'activité catalytique de DYRK1A et sur les performances cognitives des souris sur-exprimant la kinase a été étudiée. L'analyse a été réalisée 24 h et 48 h après l'arrêt d'un traitement quotidien de 19 jours des souris Tg(*Dyrk1a*) et leur contrôles respectifs.

3.4.1. Effet de la L41 sur l'activité kinase de DYRK1A et dans le test du NOR 24h après l'arrêt du traitement de 19 jours

Une première analyse de la rémanence de l'effet de la L41 sur l'activité catalytique de DYRK1A a d'abord été conduite avant de constituer une cohorte pour l'étude *in vivo*. Un groupe de souris wt NT (n = 3), wt T (n = 3), Tg NT (n = 3) et Tg T (n = 3) a reçu un traitement avec la L41 (20 mg/kg) ou le véhicule pendant 19 jours en i.p. Vingt-quatre heures après la dernière injection, l'activité kinase de DYRK1A a été mesurée dans des extraits de cerveau de ces souris (**Figure 18**). Le graphe indique que celle-ci est bien supérieure dans les souris Tg NT comparées aux animaux contrôles (p = 0.02). L'activité catalytique des Tg T reste inhibée par la L41 24 h après le dernier traitement, elle est ramenée significativement à un niveau basal similaire à celui des animaux sauvages (p = 0.02).

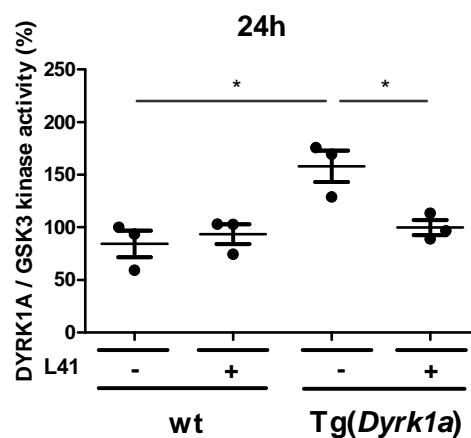


Figure 18. Activité kinase de DYRK1A dans les extraits de cerveau de souris Tg(*Dyrk1a*) et contrôles, traitées ou non à la L41, 24h après l'arrêt d'un traitement de 19 jours. * p < 0.05.

Une cohorte constituée d'animaux wt NT (n = 16), wt T (n = 15), Tg NT (n = 9) et Tg T (n = 10) a été constituée afin de tenter de corréliser la rémanence de l'effet de la L41 observée au niveau de l'activité kinase avec la correction mnésique démontrée précédemment dans le test du NOR (**Figure 19**). Les wt NT (30% Fo et 70% No, $p = 5.10^{-6}$) et wt T (35% Fo et 65% No, $p = 1.10^{-5}$) discriminent les deux objets, contrairement aux Tg NT (50% Fo et 50% No, $p = 0.95$). Par contre, les Tg T (38% Fo et 62% No, $p = 0.01$) sont également capables de reconnaître le No du Fo.

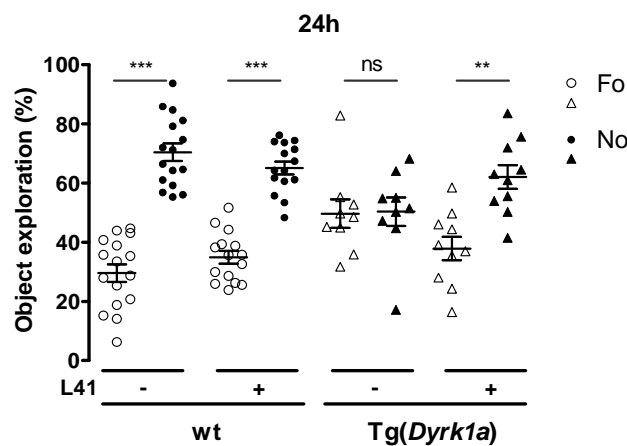


Figure 19. Effet de la L41 sur la correction mnésique des Tg(*Dyrk1a*) 24h après l'arrêt d'un traitement de 19 jours. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns non significatif.

3.4.2. Effet de la L41 sur l'activité kinase de DYRK1A 48h après l'arrêt de traitement de 19 jours

Les mêmes expériences de rémanence ont été menées 48h après l'arrêt du traitement (**Figure 20**). Un premier groupe de souris wt NT (n = 3), wt T (n = 3), Tg NT (n = 3) et Tg T (n = 3) a donc été utilisé pour l'analyse préliminaire de l'activité kinase de DYRK1A 48 h après la dernière administration. Les résultats montrent à nouveau que les Tg NT possèdent une activité catalytique de DYRK1A plus élevée que les wt NT et wt T ($p = 0.03$). Par contre, celle-ci n'est plus sensible à la L41 48 h après cessation du traitement dans les animaux Tg T ($p = 0.93$).

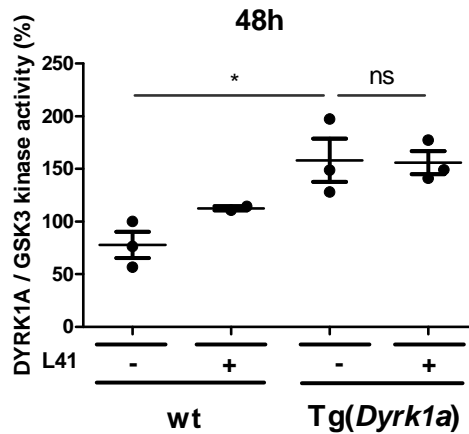


Figure 20. Activité kinase de DYRK1A dans les extraits de cerveau de souris Tg(*Dyrk1a*) et contrôles, traitées ou non à la L41, 48h après l'arrêt d'un traitement de 19 jours. * $p < 0.05$, ns non significatif.

3.5. Dose/réponse de la L41 dans l'activité kinase de DYRK1A des souris Tg(*Dyrk1a*) et contrôles

L'étude de l'effet dose/réponse de la L41 dans l'activité kinase de DYRK1A permet de répondre à deux questions. La première étant la dose minimale pour laquelle une inhibition de l'activité catalytique de DYRK1A peut être observée. La deuxième concerne les animaux sauvages traités avec la drogue. En effet, il a été surprenant de constater que toutes les souris contrôles traitées à la L41 n'ont pas été affectées au niveau de leur comportement dans les tests du NOR ou de l'OPR. En outre, l'activité catalytique de DYRK1A physiologique basal n'a pas non plus été réduite par la molécule. Afin de répondre à ces deux questions, l'activité catalytique de DYRK1A a été mesurée dans les cerveaux de deux groupes de souris traitées par 10 mg L41/kg ou par 30 mg L41/kg (la concentration de L41 administrée dans tous les tests jusqu'à présent était de 20 mg/kg). Chaque groupe était composé de souris wt NT (n = 3 ou 6), wt T (n = 3), TG NT (n = 3 ou 6) et TG T (n = 3). 10 mg/kg ne suffisent pas à inhiber l'activité de DYRK1A chez les souris transgéniques traitées (172.4 % +/- 111.3) par rapport aux non traitées (228.5 % +/- 78.5). Comme pour les souris wt traitées à 20 mg L41/kg, l'activité de DYRK1A des souris contrôle traitées (88.5 % +/- 29.9) reste au même niveau que celui des non traitées (79.5 % +/- 25.2) à 10 mg/kg (**Figure 21. A**). A 30 mg L41/kg les souris TG T présentent bien une activité catalytique réduite (70,5 % +/- 46.6) comparée à celle des TG NT (133.1 % +/-

110.1). A nouveau, aucune conséquence sur l'activité basale de DYRK1A n'a pu être constatée à 30 mg L41/kg chez les wt T (66.2 % +/- 37.8) par rapport aux wt NT (74.8 % +/- 52.3) (**Figure 21. B**).

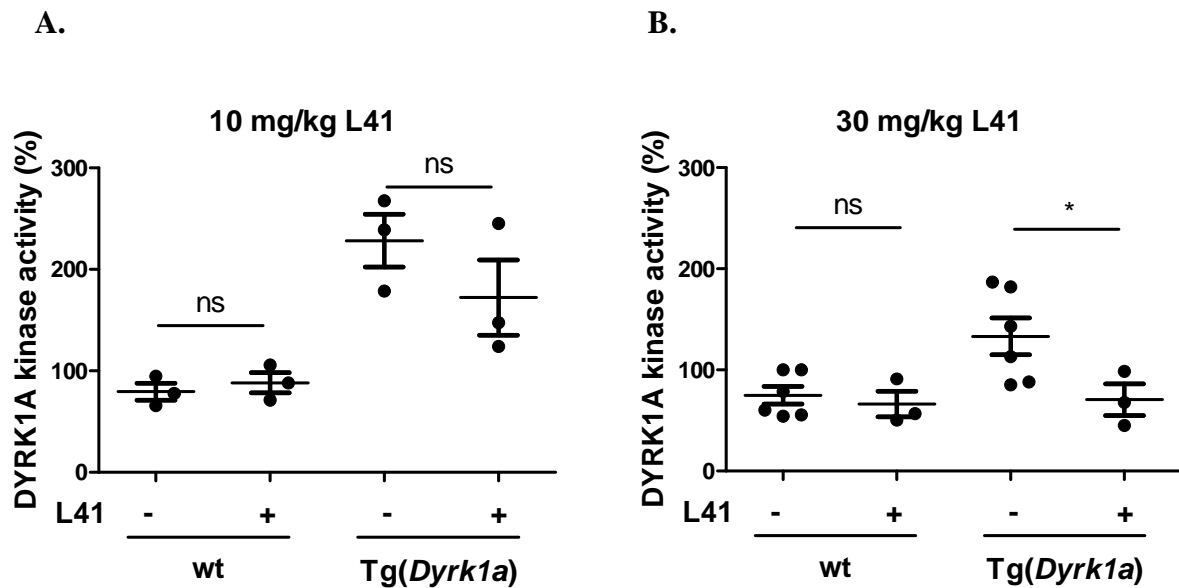


Figure 21. Dosage de l'activité kinase de DYRK1A (%) dans des extraits de cerveaux de souris *Tg(Dyrk1a)* et contrôles traitées ou non avec deux doses différentes en L41. **A.** 10 mg / kg de L41. **B.** 30 mg / kg de L41. * $p < 0.05$, ns non significatif.

Ces résultats indiquent que l'inhibition de l'activité kinase de DYRK1A dans les souris *Tg(Dyrk1a)* n'apparaît qu'à partir de 20 mg L41/kg. En revanche, l'activité catalytique basale de DYRK1A dans les animaux sauvages n'est pas affectée, quelle que soit la dose utilisée (10, 20, 30 mg/kg) L41. En d'autres termes, la kinase DYRK1A basale semble inaccessible à l'inhibition par la L41 *in vivo*. Cependant lorsque la DYRK1A est immunopurifiée à partir de cerveaux de souris contrôles ou transgéniques, et son activité catalytique mesurée en présence d'une gamme croissante de concentrations de L41, une courbe dose/réponse d'inhibition quasi-complète est obtenue (Nadège Loaëc, non publié), ce qui indique que la DYRK1A du cerveau de souris peut, en principe, être totalement inhibée par la L41. *In vivo*, un facteur empêche donc l'accès de la DYRK1A basale, mais pas la DYRK1A qui est produite en excès en raison de la triploïdie du gène *Dyrk1a*, à la Leucettine L41. Une expression tissulaire ou intracellulaire différentielle pourrait expliquer une telle différence d'accessibilité de la drogue à sa cible.

3.6. Expression de DYRK1A et dosage de la L41 subcellulaire

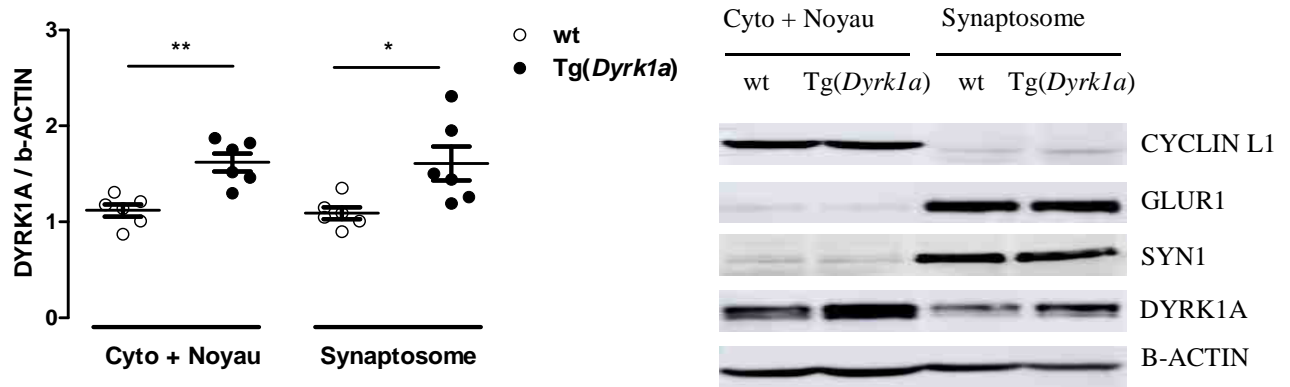
L'activité basale de DYRK1A dans les souris contrôles paraît insensible à la L41 quelque soit la dose administrée. Une hypothèse voudrait que la distribution de la L41 au niveau subcellulaire varie en fonction du génotype. Mais avant de tester cette hypothèse, il a fallu d'abord déterminer l'expression de DYRK1A dans différents compartiments cellulaires, à savoir le noyau, le cytoplasme et le synaptosome dans les cerveaux des souris transgéniques et des souris contrôles.

3.6.1. Expression subcellulaire de DYRK1A dans les souris Tg(*Dyrk1a*) et contrôles

Les cerveaux d'un premier groupe de souris Tg(*Dyrk1a*) (n = 7) et sauvages (n = 7) ont fait l'objet d'un fractionnement subcellulaire visant à isoler d'une part le cytoplasme contenant également la fraction nucléaire, et d'autre part les synaptosomes. Les cerveaux d'un second groupe, également constitué d'animaux Tg(*Dyrk1a*) (n = 6) et contrôles (n = 6), ont subi un fractionnement subcellulaire permettant de séparer le compartiment cytoplasmique contenant les synaptosomes de la partie nucléaire. L'enrichissement des différentes fractions subcellulaires a ensuite été contrôlé par western blot en utilisant des marqueurs spécifiques de chacun des compartiments. Ainsi, pour le premier groupe, les anticorps CYCLINE L1, GLUR1, et SYN-1 ont été utilisés comme marqueurs du cytoplasme + noyau, de la post-synapse et de la pré-synapse respectivement. Pour le second groupe, ce sont PSD95 et H2B qui ont servi de marqueurs du cytoplasme + synaptosome et du noyau respectivement. Le taux de DYRK1A a été quantifié dans chaque préparation subcellulaire. DYRK1A est détectable dans les trois compartiments mais est significativement augmentée ($p = 0.001$) dans le cytoplasme + noyau des souris Tg(*Dyrk1a*) (1.62 unités arbitraires UA +/- 0.09) par rapport aux contrôles (1.12 UA +/- 0.06). Il en est de même ($p = 0.02$) pour la fraction synaptosomale des animaux transgéniques (1.61 UA +/- 0.18) comparée aux sauvages (1.09 UA +/- 0.06) (**Figure 22. A.**). DYRK1A est également surexprimée de manière significative ($p = 0.006$) au niveau du cytoplasme + synaptosome des Tg(*Dyrk1a*) (2.15 UA +/- 0.3) par rapport aux contrôles (1.13 UA +/- 0.2). En revanche, aucune différence ($p = 0.9$) n'a été détectée dans les noyaux entre les Tg(*Dyrk1a*) (0.45 UA +/- 0.1) et les sauvages (0.48 UA +/- 0.1) (**Figure 22. B.**). Ces résultats signifient que dans les souris Tg(*Dyrk1a*), le surdosage de DYRK1A n'affecte pas le pool de

DYRK1A nucléaire, mais que l'augmentation d'expression est plutôt localisée dans les compartiments cytoplasmique et synaptosomal.

A.



B.

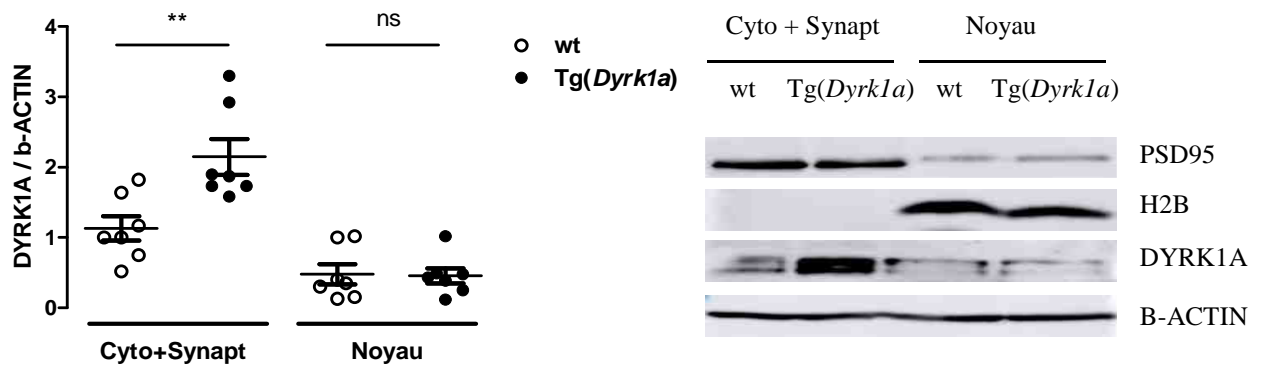


Figure 22. Expression subcellulaire de la protéine kinase DYRK1A dans les souris Tg(*Dyrk1a*) et contrôles. A. Graphe : expression de DYRK1A dans le Cytoplasme + Noyau par rapport au Synaptosome. WB : illustration de l'expression de DYRK1A dans les différents compartiments. CYCLIN L1 (55 kDa) : marqueur cytoplasmique + nucléaire ; GLUR1 (100 kDa) : marqueur post-synaptique ; SYN-1 (74 kDa) : marqueur pré-synaptique ; b-Actin (42 kDa) : protéine de ménage. B. Graphe : distribution de DYRK1A dans le Cytoplasme + Synaptosome par rapport au Noyau. WB : illustration de la distribution de DYRK1A dans les différentes fractions. PSD95 (95 kDa) : marqueur cytoplasmique + synaptosomal ; H2B (17 kDa) : marqueur nucléaire ; β -Actin (42 kDa) : protéine de ménage. Les valeurs sur les graphes sont définies en unités arbitraires (UA). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns non significatif.

3.6.2. Dosage subcellulaire de la L41 dans les cerveaux de souris Tg(*Dyrk1a*) et contrôles

Afin de connaître la distribution de la L41 au sein des différents compartiments subcellulaires (noyau et cytoplasme) selon les génotypes, un groupe d'animaux composé de souris wt NT (n = 5), wt T (n = 5), TG NT (n = 3) et TG T (n = 2) a été constitué. Les animaux traités (T) ont reçu une administration quotidienne de L41 (20 mg/kg) en i.p. pendant 19 jours, les non-traités (NT) ont reçu une administration quotidienne de véhicule. Les cerveaux ont été prélevés et l'isolation des fractions nucléaires et cytoplasmiques a été réalisée. La L41 a été dosée par spectrométrie de masse dans chacun de ces compartiments cellulaires. Les résultats montrent que la concentration en L41 dans les noyaux est la même (p = 1.0) chez les Tg(*Dyrk1a*) (0.82 nM) et les contrôles (0.80 nM). En revanche, on observe une distribution significativement moindre (p = 0.002) dans le cytoplasme des cerveaux de souris wt (1.40 nM) par rapport au cytoplasme des cerveaux de souris transgéniques (3.26 nM). Il y a donc une distribution différentielle de la L41 dans le cytoplasme en fonction du génotype (**Figure 23**). Cette bio-distribution intracellulaire de la L41 semble parallèle à la distribution de DYRK1A dans le cytoplasme vs. noyau (**Figure 20B**).

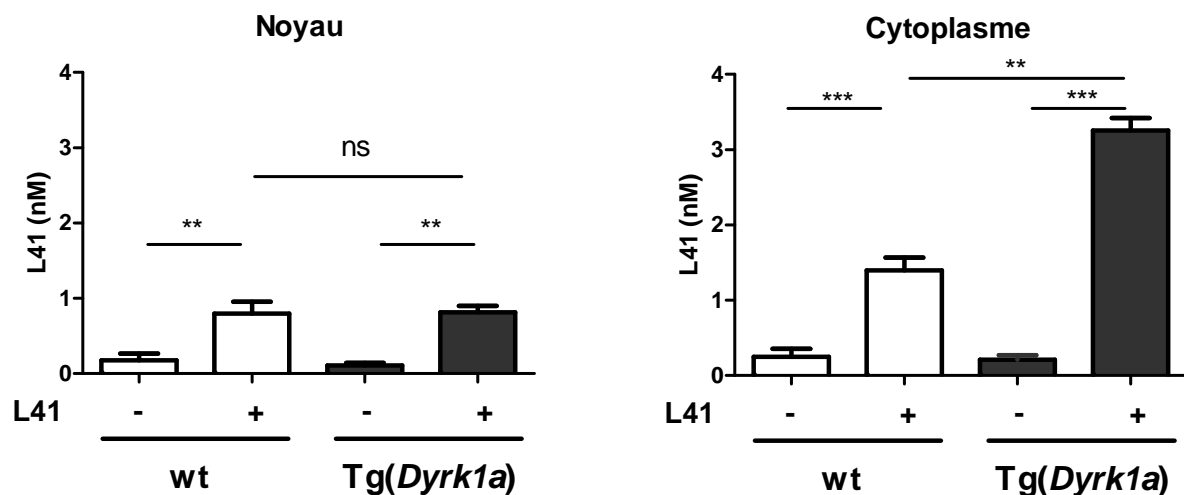


Figure 23. Dosage de la L41 (nM) dans le noyau et cytoplasme des souris Tg(*Dyrk1a*) et sauvages traitées ou non par la L41 (20 mg/kg) pendant 19 jours. ** p < 0.01, *** p < 0.001, ns non significatif.

B. Mécanismes biologiques sous-jacents aux déficits mnésiques observés dans les modèles murins de la T21 et restaurés par la L41

De nombreuses fonctions biologiques sont dérégulées lorsque DYRK1A est surexprimé. En effet, l'hyper-phosphorylation des substrats de cette kinase perturbe les événements physiologiques auxquels ils sont associés, et par conséquent représente la cause très probable des troubles sévères observés dans le SD tels que la diminution des performances intellectuelles ou l'apparition de certains symptômes de la maladie d'Alzheimer.

Afin de mieux comprendre la restauration des déficits cognitifs par la L41 dans les souris trisomiques comme démontré dans le test du NOR, il a fallu mettre en lumière les processus biologiques qui étaient altérés par la T21 puis corrigés par la L41. Pour ce faire, une étude du phosphoprotéome a été réalisée à partir d'extraits d'hippocampes, de cortex et de cervelets d'animaux transgéniques Tg(*Dyrk1a*) et Ts65Dn ainsi que de leur contrôles respectifs, traités quotidiennement par la L41 (20 mg /kg) ou le véhicule, par voie i.p. et pendant 19 jours. Ces trois régions ont été choisies en raison de leur implication dans le processus de la mémoire de reconnaissance que nous avons mesurée dans le test du NOR. Des travaux précédents (Albasser et al., 2010) ont montré que le processus de cheminement de cette mémoire débutait tout d'abord dans le cortex entorhinal, passait par le cortex préfrontal pour s'achever enfin dans l'hippocampe. Le cervelet a été ajouté à cette analyse puisque des études récentes démontrent son influence sur les tâches hippocampe-dépendantes et inversement (Yu and Krook-Magnuson, 2015).

3.7. Modification du phosphoprotéome par le surdosage de DYRK1A

Environ un millier de protéines (deux fois plus de peptides analysés) a été détecté dans l'analyse phosphoprotéomique dans les deux modèles et dans chaque région du cerveau. Parmi l'ensemble des protéines et peptides identifiés, seuls 30% des protéines et 20% des peptides sont significativement modulés. Une modulation signifie que la protéine ou le peptide est sur- ou sous- phosphorylé dans le modèle trisomique par rapport au sauvage, ET inversement régulé dans les animaux T21 traités par la L41 comparés aux non traités. On peut constater qu'une grande majorité (80%) des peptides est phosphorylée sur un résidu sérine, le reste étant phosphorylé sur un résidu thréonine (15%) ou tyrosine (5%). Enfin, moins de 5% des protéines/peptides sont doublement phosphorylés. Parmi ces peptides phosphorylés, très peu contiennent le site consensus de phosphorylation de DYRK1A (R-P-x(1,3)-S/T-P), la grande majorité des sites correspondant à des sites de phosphorylation consensus potentielle par d'autres kinases connues (**Table 1**).

Model	Brain region	Total protein	Total peptide	Proteins modulated Tg/Ts vs wt	Peptides modulated Tg/Ts vs wt	Proteins modulated Tg/Ts and L41	Peptides modulated Tg/Ts and L41	Peptides pS	Peptides pT	Peptides pY	Peptides pS/T	Peptides pS/Y	Peptides pT/Y	Peptides DYRK1A specific	Peptides phosphorylated by other kinases
Tg(<i>Dyrk1a</i>)	HIPP	886	1384	275	333	267	321	265	39	17	18	5	6	1	279
	CORTEX	948	1523	256	296	240	275	221	44	10	19	1	1	7	251
	CERVELET	1229	2004	364	437	344	403	333	58	12	23	4	4	8	383
Ts65Dn	HIPP	886	1384	257	311	253	307	246	53	8	10	2	7	6	263
	CORTEX	948	1523	230	270	228	265	205	42	18	6	3	4	3	223
	CERVELET	1229	2004	365	422	355	410	320	75	15	24	4	2	6	351

Table 1. Tableau récapitulatif de l'analyse phosphoprotéomique.

Les phosphoprotéines dérégulées par la trisomie (sur- ou sous-phosphorylées) et qui sont ensuite modulées par le traitement à la L41 (sous- ou sur-phosphorylées) ont été sélectionnées pour la suite de l'étude. Les analyses ont d'abord été conduites dans chaque région du cerveau et dans chacun des deux modèles. On peut constater qu'il y a 258 et 248 phosphoprotéines qui répondent à ces critères pour la partie hippocampique des Tg(*Dyrk1a*) et Ts65Dn, respectivement. De même, le cortex de ces deux modèles présente respectivement 238 et 223 phosphoprotéines dérégulées par la triploïdie et modulée en sens inverse par la L41. Enfin, dans le cervelet on en retrouve 330 et 341 phosphoprotéines modulées en sens opposé

par la trisomie et par le traitement. Parmi ces phosphoprotéines, 102, 88 et 124 sont communes aux deux modèles transgéniques, respectivement dans l'hippocampe, le cortex et le cervelet (**Figure 24**). Ces dernières ont été analysées dans DAVID et les résultats révèlent un enrichissement dans les fonctions synaptiques, du cytosquelette et d'apprentissage (**Table 2**). L'analyse dans ToppCluster de ces phosphoprotéines confirme l'enrichissement dans les activités synaptiques communes aux régions de l'hippocampe et du cortex dans les deux modèles. L'enrichissement dans l'organisation du cytosquelette est observé dans les trois régions des deux modèles (**Figure 25**).

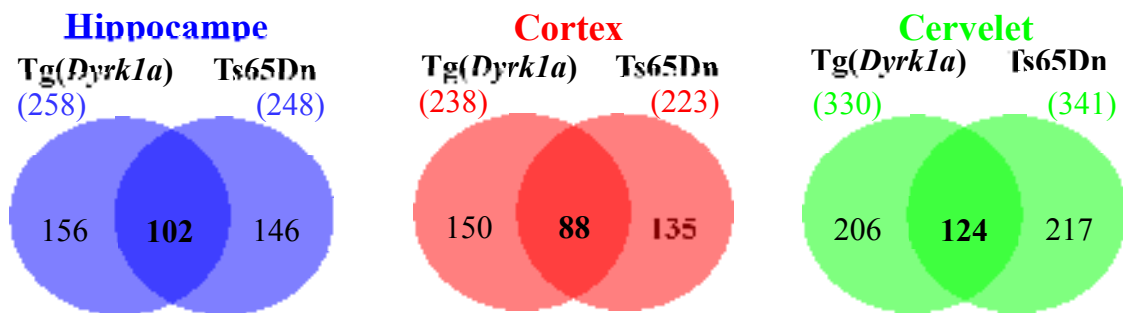


Figure 24. Phosphoprotéines dérégulées par l'excès de DYRK1A et modulées en sens inverse par la L41, pour chaque région du cerveau des souris Tg(*Dyrk1a*) et Ts65Dn.

Cortex (88)

Hippocampe (102)

Biological process	ES
Synapse	2.3
Intermediate filament	2.25
Coated vesicle	2.07
Synaptic transmission	2.03
Cytoskeletal part	1.66
Synapse part	1.62
Transmission of nerve impulse	1.52
Anion: cation symporter activity	1.4
Calcium ion binding	1.08
Regulation of synaptic transmission	1.07
Ion transport	1.03

Biological process	ES
Synaptic transmission	2.62
Cytoskeleton	2.06
Plasma membrane	2.03
GTPase regulator activity	2.00
Cytoskeletal protein binding	1.84
Behavior	1.75
Cytoplasmic vesicle	1.70

Cervelet (124)

Biological process	ES
Cell junction	3.89
GTPase regulator activity	2.64
Cell-cell signaling	2.40
Homeostatic process	2.12
Cytoskeleton	1.92
Regulation of cellular component size	1.91
Cell motility	1.82
Learning	1.73

Table 2. Analyse des processus biologiques enrichis selon l'analyse DAVID.

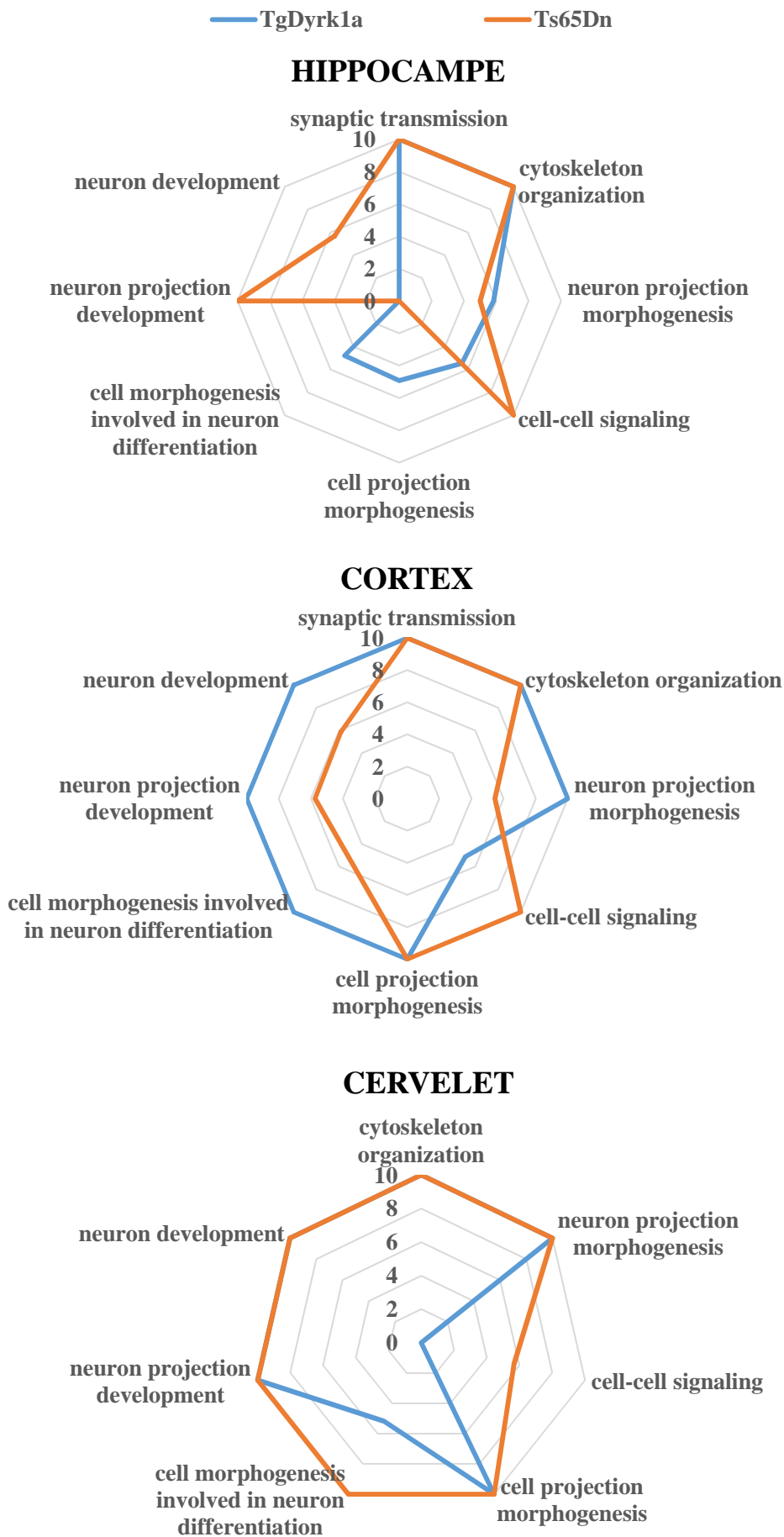


Figure 25. Analyse des fonctions biologiques enrichies dans ToppCluster

Ces phosphoprotéines ont ensuite été analysées dans les trois régions du cerveau de chaque modèle : on ne retrouve que 16 phosphoprotéines dérégulées/modulées partagées par les trois régions du cerveau des Tg(*Dyrk1a*), et 22 dans les trois régions du cerveau des Ts65Dn. Lorsque l'on compare les deux modèles à ce niveau, il n'y a que les protéines associées aux microtubules MAP1A, MAP1B et MAP2, et deux protéines présynaptiques PICCOLO et SYNAPSINE 1 qui soient dérégulées à la fois dans les trois régions du cerveau et dans les deux modèles (**Figure 26**). Ceci renforce des précédents résultats qui montrent que MAP1A (phosphorylée sur Thr2059) et MAP1B (Ser1392) sont des substrats de DYRK1A (Murakami et al., 2012; Scales et al., 2009). Ces 5 phosphoprotéines ont donc été étudiées en détail au niveau de leur site de phosphorylation modifié par la condition trisomique puis par le traitement à la L41 dans notre analyse phosphoprotéomique. Les résultats sont schématisés ci-dessous et illustrent la complexité de la conséquence d'une simple copie supplémentaire du seul gène DYRK1A (Tg(*Dyrk1a*)) ou d'une partie du chromosome 16 (Ts65Dn), ainsi que la complexité résultant d'un traitement par un simple agent pharmacologique. Parmi ces 5 phosphoprotéines, nous nous sommes focalisés sur les résidus qui étaient hyper-phosphorylés lorsque DYRK1A est surexprimée, et dont la phosphorylation était diminuée quand DYRK1A est inhibée par la L41, et enfin qui appartiennent à la séquence consensus de phosphorylation de DYRK1A. Sur la base de ces critères très restrictifs, seul un résidu a été mis en évidence : la sérine 551 de la protéine SYNAPSINE 1 (**Figure 27**).

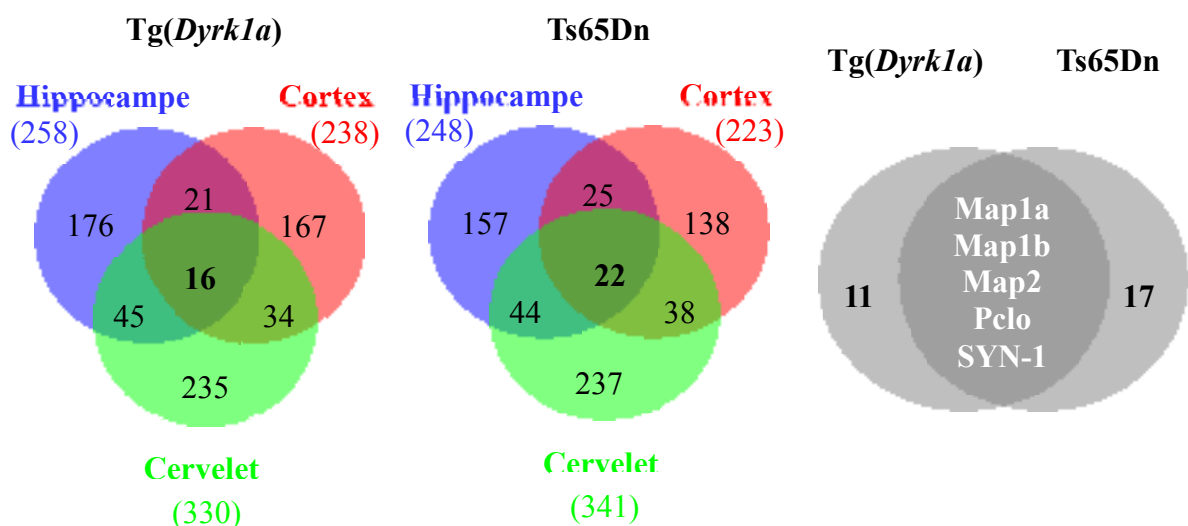


Figure 26. Comparaison des phosphoprotéines communes aux trois régions du cerveau de chaque modèle. Mise en évidence des 5 phosphoprotéines communes aux trois régions et aux deux modèles.

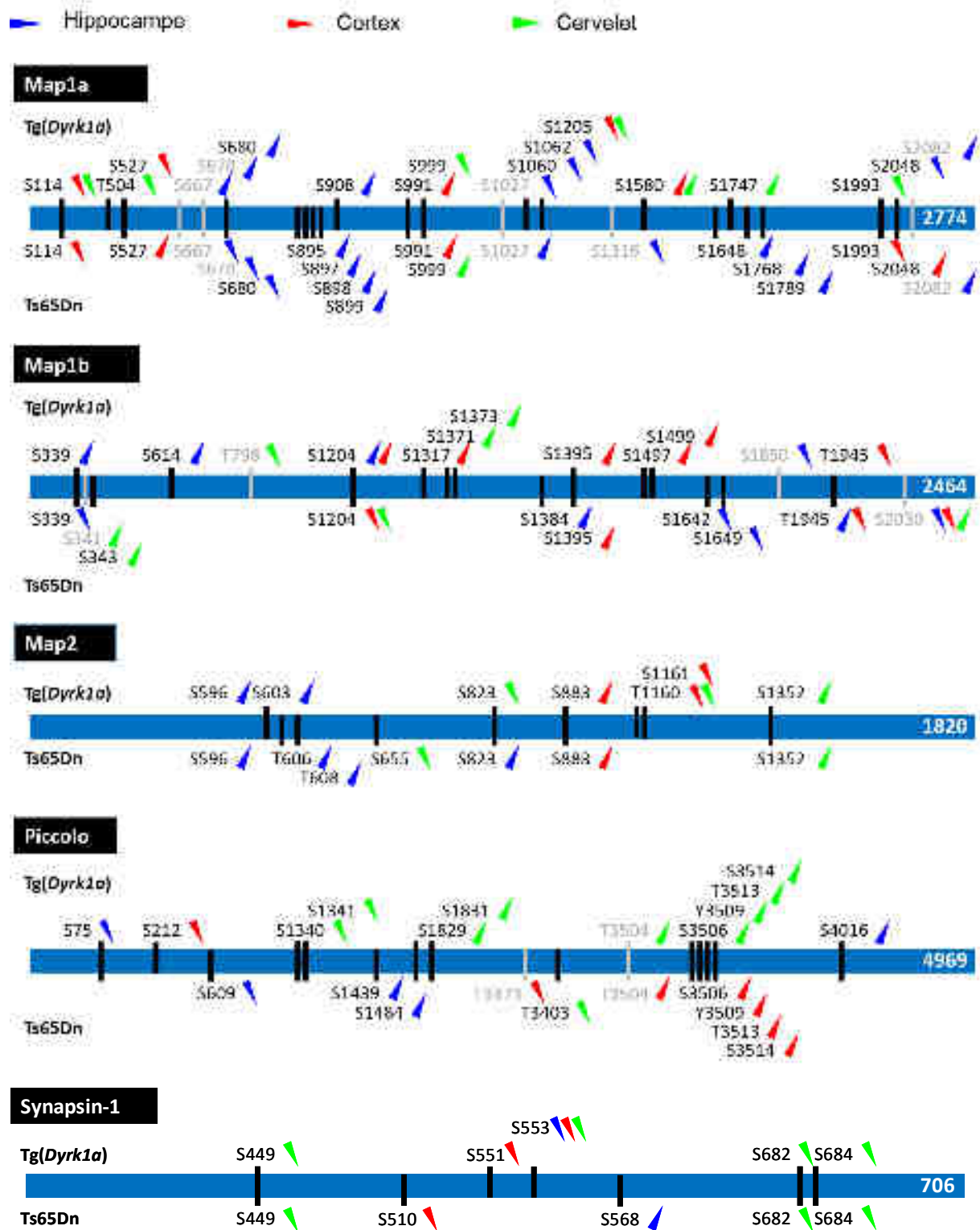


Figure 27. Sites de phosphorylation des protéines MAP1A, MAP1B, MAP2, PICCOLO et SYNAPSIN-1, modulés par le traitement à la L41.

Une flèche ascendante signifie que le résidu renseigné avant la flèche est tout d'abord sous-phosphorylé par la trisomie puis hyper-phosphorylé après le traitement à la L41. Une flèche descendante signifie que le résidu est tout d'abord sous-phosphorylé par la

trisomie puis sur-phosphorylé après le traitement à la L41. Un résidu apparaissant en grisé signifie que cet acide aminé n'est pas conservé chez l'Homme. Le nombre d'acide aminé de chaque protéine est indiqué à la fin de la frise.

3.8. Le complexe SYNAPSINE 1 et DYRK1A

Pour chacune des 5 phosphoprotéines mentionnées précédemment qui sont communes à l'hippocampe, au cortex et au cervelet ainsi qu'aux deux modèles Tg(*Dyrk1a*) et Ts65Dn, le motif de phosphorylation de DYRK1A a été recherché au sein de leurs séquences peptidiques identifiées dans l'analyse du phosphoprotéome. Seule la SYNAPSINE 1 (SYN-1) répond à ce critère. En effet, la séquence RPPASP correspondant au motif de phosphorylation de DYRK1A (R-P-x(1,3)-S/T-P) a été identifiée dans les trois sous-structures du cerveau des animaux Tg(*Dyrk1a*) (séquence indiquée en rouge dans la **Suppl. Table 2**). Cependant, la sérine du motif de phosphorylation est seulement modulée de manière significative au niveau du cortex de ces souris. Il s'agit de la sérine en position 551 de la protéine dont la phosphorylation est augmentée significativement par le surdosage de DYRK1A dans les souris transgéniques par rapport aux sauvages et normalisée ensuite par le traitement à la L41 (résidu renseigné en bleu dans la **Suppl Table 2**).

Afin de vérifier l'interaction possible de DYRK1A avec la protéine SYN-1, une co-immunoprécipitation (Co-IP) a été réalisée à partir de lysat de cerveau de souris mâle sauvage âgée de 3 mois. DYRK1A et SYN-1 ont donc été immuno-précipitées séparément (**Figure 28**). Elles ont ensuite été révélées avec leur anticorps correspondants par western blot pour confirmer la précipitation. Comme attendu, DYRK1A et SYN-1 sont présent dans leur IP respective. La GAPDH a été utilisée comme contrôle négatif car elle n'est pas connue comme partenaire de ces deux protéines. DYRK1A est détectée dans l'IP de SYN-1, et SYN-1 est détectée dans l'IP de DYRK1A, suggérant que ces deux protéines sont associées dans ces extraits de cerveau. Les western blots montrent également la présence de CAMK2 dans l'IP de SYN-1, résultat attendu en tant que contrôle positif au vu d'anciens travaux montrant l'interaction de ces deux protéines (Benfenati et al., 1992; Llinás et al., 1985). Enfin, CAMK2 est également révélée dans l'IP de DYRK1A, indiquant donc que DYRK1A fait partie du complexe avec SYN-1 et CAMK2.

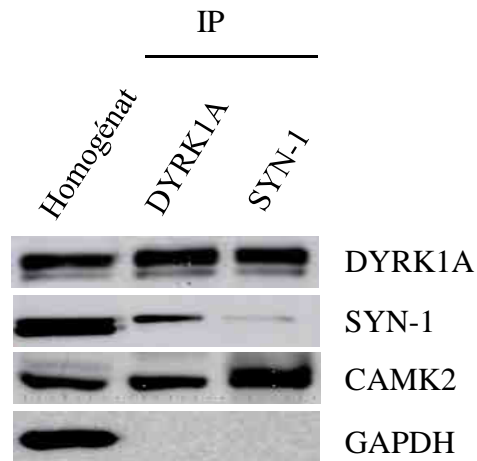


Figure 28. Mise en évidence par western blot des protéines DYRK1A (85 kDa), SYN-1 (74 kDa), CAMK2 (50 kDa) et GAPDH (37 kDa) dans les fractions d'homogénat et d'immunoprecipitation (IP) de DYRK1A et SYN-1.

Pour vérifier si DYRK1A est capable de phosphoryler directement SYN-1, des essais kinases ont été effectués avec une DYRK1A recombinante et différents peptides dérivés de SYN-1, comprenant une séquence autour de la Ser551, sont utilisés comme substrats potentiels (Table 3).

Nom du peptide	Séquence
Woodtide	KKISG[RLS ³²⁹ P]IMTEQ
SYN-1-tide	RQSRPVAGGPGAPPAA[RPPAS ⁵⁵¹ P]S ⁵⁵³ PQRQ
SYN-1-S551A	RQSRPVAGGPGAPPAA[RPPAA ⁵⁵¹ P]S ⁵⁵³ PQRQ
SYN-1-S553A	RQSRPVAGGPGAPPAA[RPPAS ⁵⁵¹ P]A ⁵⁵³ PQRQ

Table 3. Séquence des peptides utilisés dans les essais kinases. En rouge, le résidu phosphorylé. En bleu, le résidu muté.

Le peptide utilisé comme le contrôle positif de cette étude correspond à une séquence de 14 acides aminés issue du facteur de transcription FKHR. Cette séquence contient le résidu Ser329 déjà décrit dans de précédents travaux comme phosphorylé par DYRK1A (Woods et

al., 2001c). Ce peptide contrôle est appelé ici Woodtide. La phosphorylation de SYN-1 par la protéine recombinante a été déterminée par l'utilisation du peptide synthétique SYN-1-tide comprenant la sérine en position 551 de la protéine. Un peptide similaire, dans lequel la Ser551 est remplacée par une alanine (SYN-1-S551A) a également été utilisé afin de vérifier la spécificité de la phosphorylation de DYRK1A sur ce résidu. Enfin, pour s'assurer que la sérine en position 553 n'intervient pas dans la phosphorylation observée, un troisième peptide a été utilisé, dans lequel la Ser553 est remplacée par une alanine (SYN-1-S553A). Comme indiqué sur le graphe (**Figure 29**), la protéine recombinante DYRK1A phosphoryle bien les peptides SYN-1-tide (71.71 % +/- 5.2 %), SYN-1-S553A (70.1 % CPM) et le peptide contrôle Woodtide (78.4 % +/- 11.4 %). En revanche, le peptide SYN-1-S551A n'est pas phosphorylé par DYRK1A (7.79 % +/- 1.2 %). Ceci signifie que DYRK1A est capable de phosphoryler le peptide SYN-1-tide spécifiquement sur le résidu S551 et confirme également que DYRK1A n'a pas d'activité sur la Ser553. A noter qu'aucune activité kinase n'a pu être mesurée sur la protéine recombinante DYRK1A seule ou les différents peptides seuls.

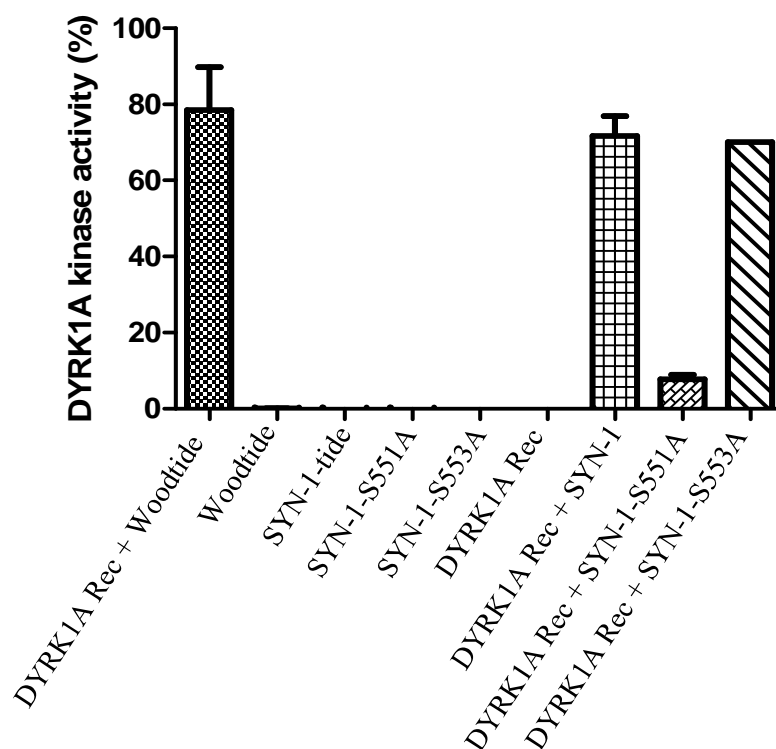


Figure 29. Mesure de l'activité kinase (%) d'une protéine recombinante DYRK1A vis-à-vis de différents peptides SYN-1, SYN-1-S551A et SYN-1-S553A.

Un nouveau rôle de DYRK1A dans la transmission présynaptique est ainsi suggéré, à savoir son implication dans le contrôle du pool de recyclage des vésicules à la présynapse que DYRK1A pourrait réguler par l'intermédiaire de la phosphorylation de la SYNAPSINE 1.

3.9. Conséquences de l'interaction de DYRK1A/SYN-1 in vivo et effet de la L41.

Afin de clarifier l'impact de la phosphorylation de SYN-1 par DYRK1A sur les vésicules présynaptiques, une analyse ultra-structurale au niveau des synapses des souris *Tg(Dyrk1a)* et souris contrôles a été menée. En effet, il a été rapporté que des phosphorylations de SYN-1 entraînent des modifications du pool de recyclage présynaptique (Cesca et al., 2010), contrôlant ainsi le relargage des vésicules synaptiques (SVs) à la zone active. Notre étude a donc été réalisée au niveau des trois régions hippocampiques recevant l'information par les fibres perforantes du cortex entorhinal, à savoir le CA1, CA3 et le gyrus denté (**Figure 30**).

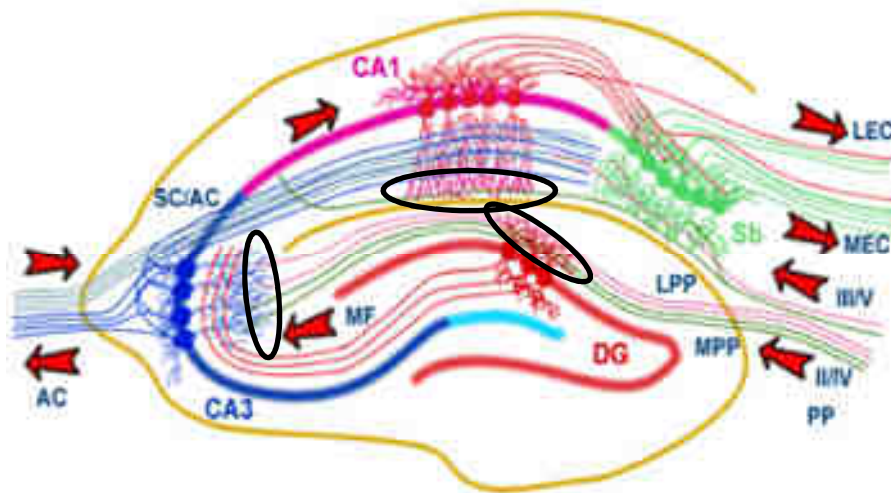


Figure 30. Les trois régions de l'hippocampe sélectionnées (encerclées en noir) pour l'analyse ultra-structurale des synapses des souris *Tg(Dyrk1a)* traitées ou non à la L41 et leurs contrôles correspondants (<http://www.bristol.ac.uk/synaptic/pathways>).

Les SVs ont donc été directement comptées sur les micrographes, en excluant dans la mesure du possible les boutons présynaptiques spécifiques des cellules granulaires du gyrus dentés ainsi que des collatérales de Schaeffer. Les valeurs obtenues ont été ensuite converties en nombre de SVs par μm^2 . Les résultats montrent une diminution significative du nombre de SVs de la présynapse des trois zones hippocampiques étudiées dans les animaux Tg(*Dyrk1a*) comparés aux souris sauvages (CA3 : 367 SVs / μm^2 +/- 57 pour les wt, 185 SVs / μm^2 +/- 34 pour les Tg, $p = 0.05$. CA1 : 411 SVs / μm^2 +/- 88 pour les wt, 144 SVs / μm^2 +/- 25 pour les Tg, $p = 0.04$. DG : 388 SVs / μm^2 +/- 61 pour les wt, 156 SVs / μm^2 +/- 29 pour les Tg, $p = 0.03$) (**Figure 31**). Ceci indique que le complexe DYRK1A et SYN-1 contrôle le relargage des SVs à la zone active qui est altéré dans les souris transgéniques lorsque DYRK1A est surexprimée.

La quantification des SVs a également été établie pour les animaux Tg(*Dyrk1a*) traités à la L41 afin de voir si la drogue était capable d'influencer le nombre de vésicules présynaptiques. Les résultats ne montrent aucune différence significative sur la quantité de SVs présentes dans les souris transgéniques traitées par rapport aux non traitées, suggérant que dans ce cas, l'inhibiteur de DYRK1A n'agit pas au niveau de ce mécanisme biologique (CA3 : 185 SVs / μm^2 +/- 34 pour les Tg NT, 186 SVs / μm^2 +/- 12 pour les Tg T, $p = 0.99$. CA1 : 144 SVs / μm^2 +/- 25 pour les Tg NT, 196 SVs / μm^2 +/- 12 pour les Tg T, $p = 0.14$. DG : 156 SVs / μm^2 +/- 29 pour les Tg NT, 165 SVs / μm^2 +/- 4 pour les Tg T, $p = 0.77$) (**Figure 31**).

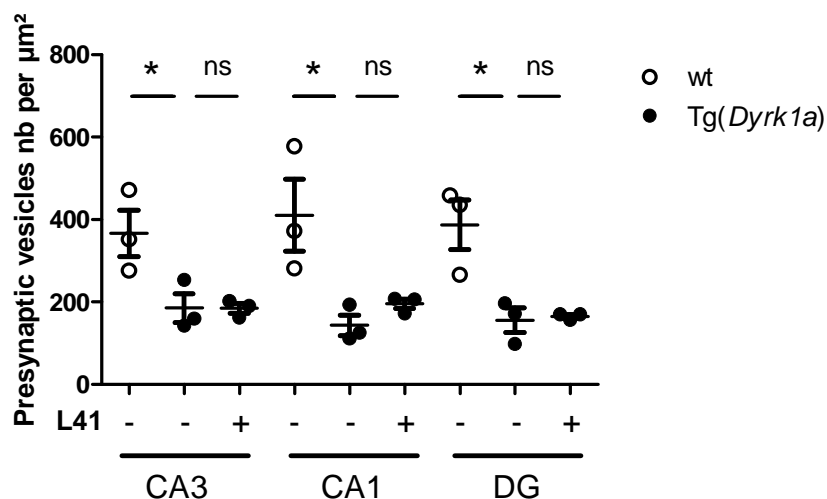


Figure 31. Quantification des vésicules présynaptiques dans les régions hippocampiques du CA3, CA1 et DG (gyrus denté) des souris Tg(*Dyrk1a*) traitées ou non à la L41 et leurs contrôles correspondants. * $p < 0.05$, n.s. non significatif.

3.10. Autres partenaires de DYRK1A révélés par l'analyse du phosphoprotéome

3.10.1. DYRK1A et KIF2A

Parmi les protéines détectées dans l'analyse du phosphoprotéome, d'autres protéines que la SYNAPSINE 1 présentaient le motif de phosphorylation de DYRK1A dans leur séquence peptidique modulée dans leur état de phosphorylation par la condition trisomique puis par le traitement à la L41 (motif renseigné en rouge dans la **Suppl. Table 3**). Nous avons donc voulu vérifier par co-immunoprécipitation si ces protéines pouvaient interagir avec DYRK1A. Parmi elles se trouvent la protéine Kinesin Family Member A2 ou KIF2A qui est sur-phosphorylée de manière significative dans les Tg(*Dyrk1a*) et Ts65Dn puis sous-phosphorylée après le traitement à la L41 au niveau du cervelet (**Suppl. Table 3**). DYRK1A et KIF2A ont donc été immuno-précipitées séparément dans des extraits de cerveau de souris sauvage adulte (**Figure 32**). L'immunoprécipitation de ces deux protéines a été confirmée par western blot : elles sont bien présentes dans leur IP respective. La GAPDH, contrôle négatif, est absente dans les deux IP. La bande correspondant à DYRK1A est observée dans l'IP de KIF2A. Inversement, le signal correspondant à KIF2A est présent dans l'IP de DYRK1A. Ces résultats suggèrent donc que DYRK1A et KIF2A sont co-immunoprécipitées et pourraient interagir l'une avec l'autre, soit directement, soit indirectement.

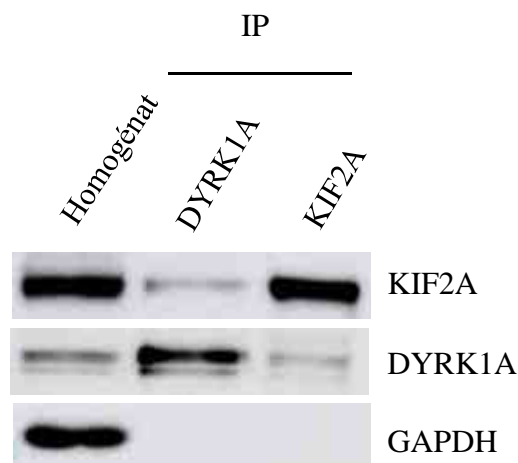


Figure 32. Détection par western blot des protéines DYRK1A (85 kDa), KIF2A (110 kDa), et GAPDH (37 kDa) dans les fractions d'homogénat et d'immunoprecipitation (IP) de DYRK1A et KIF2A.

Des essais kinases ont ensuite été effectués afin de vérifier si DYRK1A pouvait phosphoryler directement KIF2A au niveau de la Ser545 identifiée dans notre analyse phosphoprotéomique (**Figure 33**). Les résultats ont montré qu'aucune phosphorylation n'a pu être mesurée (0.9 % +/- 0.06) lorsque la protéine DYRK1A recombinante est mise en présence du peptide KIF2A-tide contenant la Ser545. La kinase est bien active, comme vérifié avec le peptide contrôle, Woodtide (63.6 % +/- 22.09). Comme attendu, les substrats seuls ou la kinase seule ne donnent aucun signal de phosphorylation (Woodtide 0.59 % +/- 0.27 ; KIF2A-tide 0 % +/- 0.17 ; DYRK1A Rec 0.07 %). DYRK1A n'est donc pas capable de phosphoryler KIF2A sur le résidu Ser545, du moins dans le peptide KIF2A-tide.

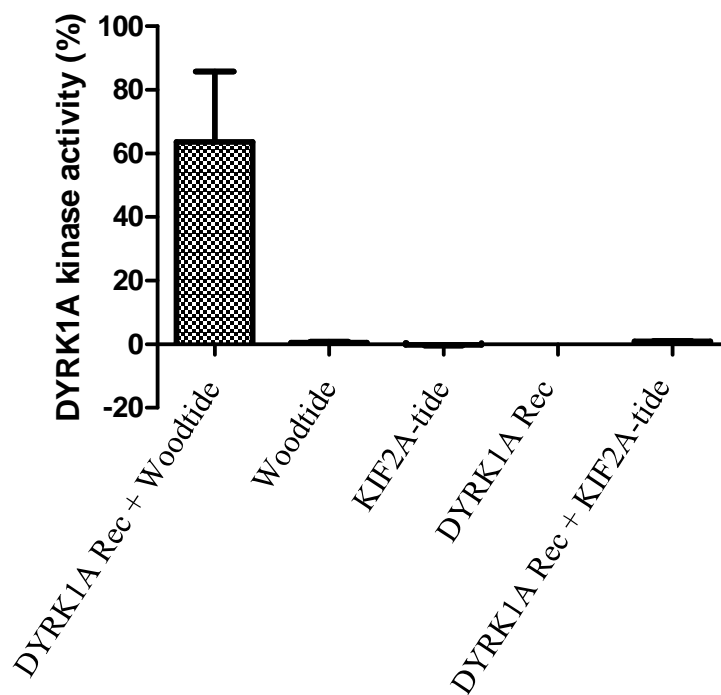


Figure 33. Mesure de l'activité kinase (%) d'une protéine recombinante DYRK1A en vis-à-vis du peptide contrôle Woodtide ou d'intérêt KIF2A-tide.

Ces résultats indiquent que DYRK1A interagit avec KIF2A mais de manière indirecte. Le rôle de la protéine KIF2A a été décrit dans le contrôle du devenir des axones collatéraux, au travers de la dépolymérisation des microtubules (Homma et al., 2003a; Moores et al., 2006). Nos

résultats vont dans le sens du rôle de DYRK1A dans l'organisation du cytosquelette démontré récemment (Ori-McKenney et al., 2016b; Park et al., 2012; Scales et al., 2009).

3.10.2. DYRK1A et NR2B

En dehors des protéines possédant la séquence consensus de phosphorylation de DYRK1A identifiés dans l'analyse du phosphoprotéome (**Suppl. Table 3**), certaines protéines ne possèdent pas cette séquence consensus mais sont cependant hyper-phosphorylées par la trisomie et déphosphorylées par le traitement par la L41. C'est le cas par exemple du récepteur membranaire glutamatergique, NR2B dans l'hippocampe des souris Tg(*Dyrk1a*) et Ts65Dn (**Table 4**).

Gene Name	Protein Group Accessions	Sequence	phosphoRS Site Probabilities	Tg(Dyrk1a) / wt	Tg(Dyrk1a)+L41 /Tg(Dyrk1a)
Nr2b	G3X9V4	QHSYDTFVDLQK	S(3): 2.9; Y(4): 97.1; T(6): 0.0	0,47	-0,09
Nr2b	G3X9V4	RQHSYDTFVDLQK	S(4): 48.4; Y(5): 48.4; T(7): 3.2	0,88	-0,69

Table 4. Séquence peptidique de NR2B hyper-phosphorylée sur le résidu d'intérêt (en bleu) par la trisomie et sous-phosphorylé suite au traitement à la L41, dans l'hippocampe des souris Tg(*Dyrk1a*) et Ts65Dn.

On constate que l'acide aminé modulé est une tyrosine. DYRK1A est définie comme une sérine/thréonine kinase, mais des travaux précédents (Walte et al., 2013) ont pu montrer que DYRK1A était capable de phosphoryler *in vitro* des protéines non identifiées de cellules HeLa sur leurs résidus tyrosine. Ainsi, l'interaction entre DYRK1A et NR2B a été étudiée par co-immunoprécipitation des deux protéines (**Figure 34**). La présence de DYRK1A et NR2B dans leur IP respective confirme l'efficacité de l'immunoprécipitation spécifique. L'absence de signal de la GAPDH, contrôle négatif, confirme la spécificité de l'IP. DYRK1A est détectée dans l'IP de NR2B, de même que NR2B est détectée dans l'IP de DYRK1A. Ces

résultats signifient que ces deux protéines sont associées dans un même complexe, de façon directe ou indirecte.

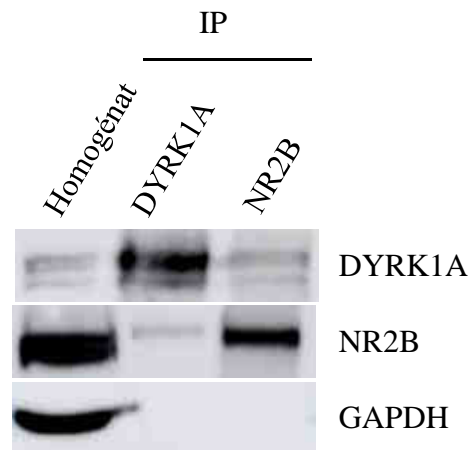


Figure 34. Détection par western blot des protéines DYRK1A (85 kDa), NR2B (180 kDa), et GAPDH (37 kDa) dans les fractions d'homogénat et d'immunoprecipitation (IP) de DYRK1A et NR2B.

Nous avons ensuite voulu mieux localiser l'interaction de DYRK1A avec NR2B au sein du neurone. En effet, NR2B est retrouvé soit le long des microtubules dendritiques où il est transporté depuis le réticulum endoplasmique vers le bouton post-synaptique, soit au niveau de la post-synapse elle-même où NR2B constitue une sous-unité des récepteurs NMDA (**Figure 35**).

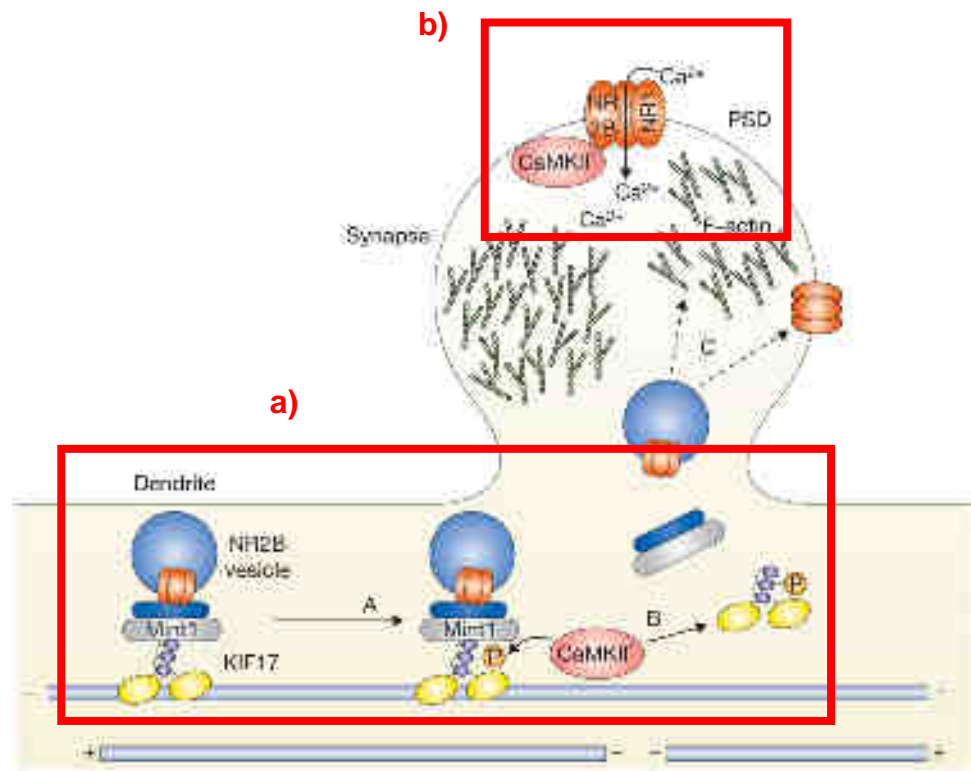


Figure 35. Schéma du transport intracellulaire de la sous-unité NR2B. La sous-unité NR2B est transportée le long des microtubules dendritiques depuis le réticulum endoplasmique vers la densité post-synaptique (PSD) via la protéine moteur KIF17 (a). Au niveau du bouton post-synaptique, NR2B constitue une des sous-unités du récepteur membranaire NMDA (b). (Ally et al., 2008)

Pour vérifier dans un premier temps si DYRK1A intervient au niveau du transport de NR2B, KIF17, la protéine qui permet l'acheminement de NR2B le long des microtubules vers la post-synapse (Guillaud et al., 2003), a été recherchée dans l'IP de DYRK1A (**Figure 36**). Les résultats du western blot montrent que KIF17 n'est pas co-immunoprécipitée avec DYRK1A, indiquant que ces deux protéines n'interagissent probablement pas ensemble. Le complexe DYRK1A et NR2B ne se situe donc probablement pas au niveau des microtubules dendritique. En d'autres termes, DYRK1A ne jouerait donc pas de rôle majeur dans le transport de NR2B dépendante de KIF17.

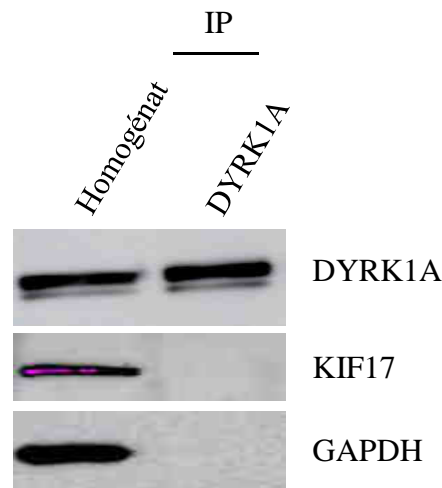


Figure 36. Détection par western blot des protéines DYRK1A (85 kDa), KIF17 (120 kDa), et GAPDH (37 kDa) dans les fractions d'homogénat et d'immunoprecipitation (IP) de DYRK1A.

La même stratégie a été adoptée pour vérifier la seconde hypothèse, à savoir la localisation du complexe DYRK1A et NR2B au niveau du récepteur NMDA post-synaptique. A noter que le récepteur NMDA fait également partie d'un complexe de la PSD faisant intervenir les protéines telles que SYNGAP, PSD95 ou encore CAMK2 (**Figure 37**).

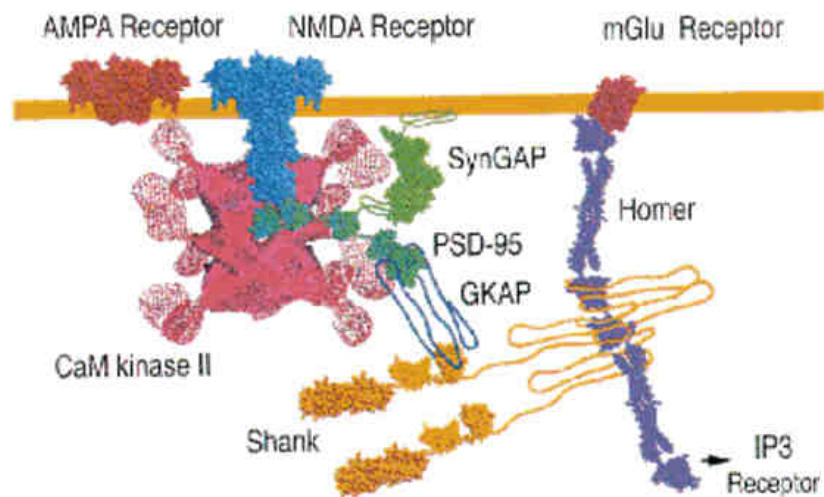


Figure 37. Schéma des récepteurs membranaires AMPA, NMDA et mGlu complexés avec les protéines de la PSD. (Kennedy, 2000)

Les protéines complexées au récepteur NMDA, et donc à NR2B, ont été recherchées dans l'IP de DYRK1A (**Figure 38**). DYRK1A apparaît dans les IP de PSD95 et SYNGAP. De plus, PSD95 et CAMK2 sont aussi détectées dans l'IP de DYRK1A. Ces résultats suggèrent que DYRK1A fait également partie du complexe NMDA-PSD. GLUR1 a ensuite été recherchée afin de déterminer la spécificité de l'interaction de DYRK1A avec le récepteur NMDA. L'absence du signal correspondant à GLUR1 dans l'IP de DYRK1A indique donc que DYRK1A interagit de manière préférentielle avec le complexe NMDA-PSD.

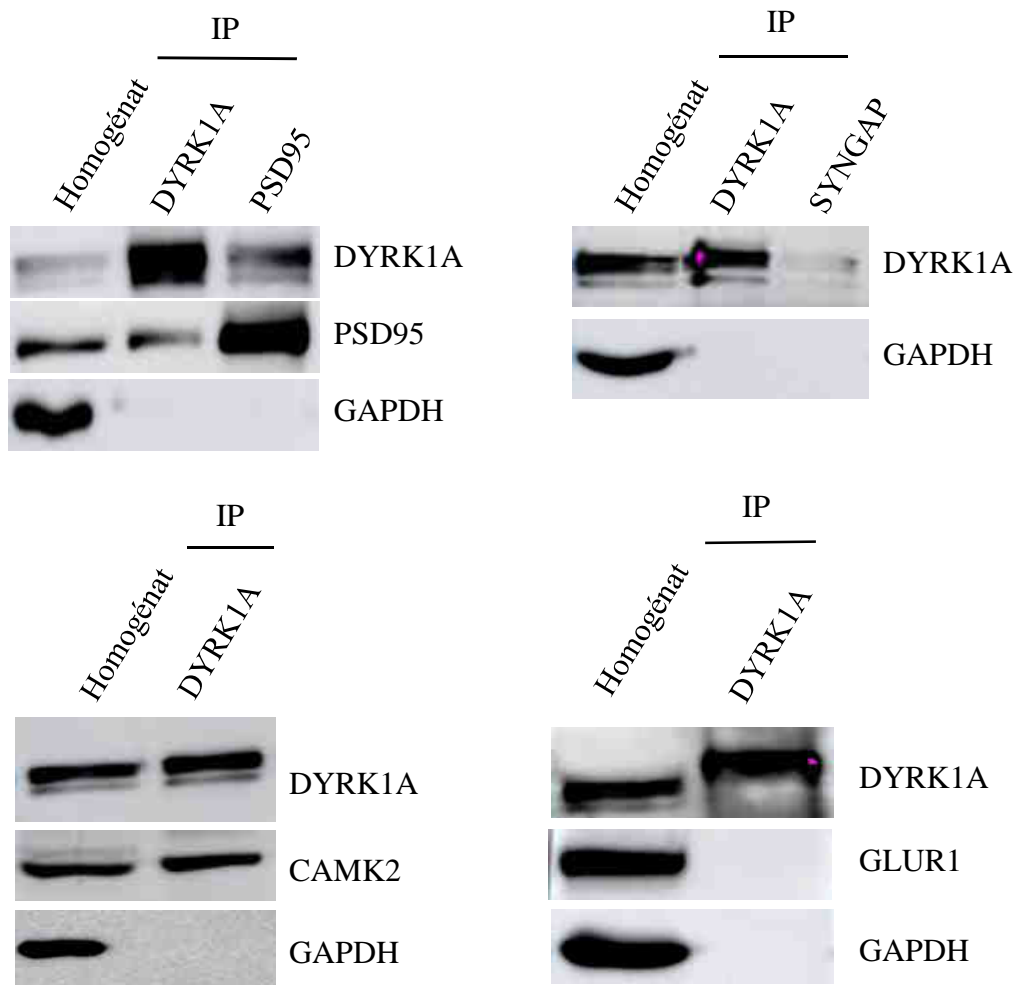


Figure 38. Détection par western blot des protéines DYRK1A (85 kDa), PSD95 (95 kDa), CAMK2 (50 kDa), GLUR1 (106 KDa) et GAPDH (37 kDa) dans les fractions d'homogénat et d'immunoprecipitation (IP) correspondante de DYRK1A, PSD95 et SYNGAP.

Les tests kinases ont ensuite permis d'évaluer si DYRK1A pouvait phosphoryler directement NR2B sur son site Tyr1304 (**Figure 39**). Les contrôles négatifs, peptides seuls ou kinase seule, ne montrent aucune phosphorylation (Woodtide 0.6 % +/- 0.3 ; NR2B-tide 0 % +/- 0.3 ; DYRK1A Rec 0.1 %). DYRK1A recombinante ne phosphoryle pas le peptide NR2B-tide contenant le résidu d'intérêt (0.80 % +/- 0.17) alors qu'elle phosphoryle bien son substrat usuel, le peptide contrôle Woodtide (63.6 % +/- 22.1). La Tyr1304 du peptide NR2B ne représente donc pas un site de phosphorylation directe pour DYRK1A.

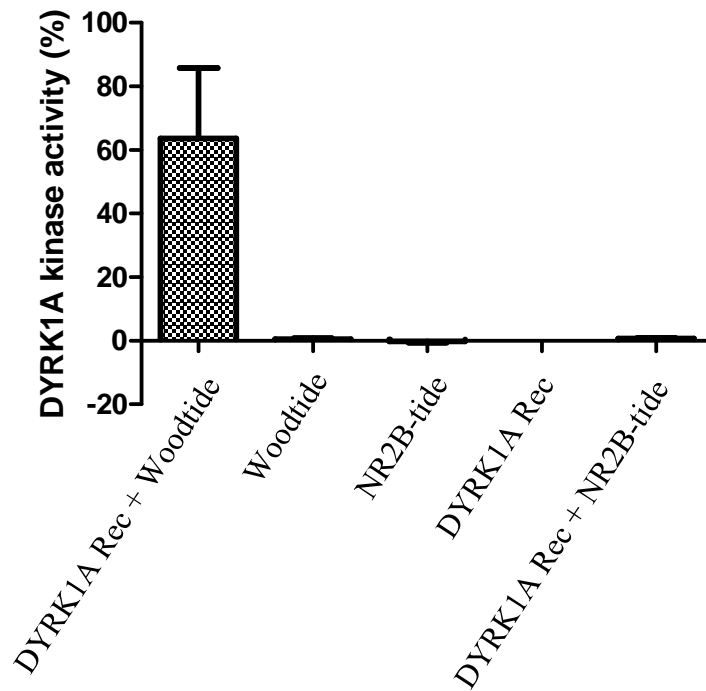


Figure 39. Mesure de l'activité kinase (%) d'une protéine recombinante DYRK1A vis-à-vis du peptide contrôle Woodtide ou d'intérêt NR2B-tide.

Bien que NR2B ne soit pas une cible directe de DYRK1A, tous ces résultats signifient néanmoins que DYRK1A pourrait participer à un complexe comprenant les protéines de la PSD. Ils suggèrent un nouveau rôle de DYRK1A dans la neurotransmission liée au glutamate via les récepteurs NMDA.

4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Mode d'action de la L41

Correction des déficits mnésiques dans le test de la reconnaissance d'objet

Dans ce projet, nous avons démontré la restauration de la mémoire de reconnaissance dans trois différents modèles de trisomie de complexité génétique différente (*Tg(Dyrk1a)*, *Ts65Dn* et *Dp1Yey*) par le traitement à la L41 et un de ses dérivés dépourvu d'activité sur les récepteurs aux cannabinoïdes, la L71. En revanche, la L41 n'est pas capable de restaurer la mémoire spatiale des animaux transgéniques dans le test de la localisation d'objet. L'hippocampe et le cortex sont les structures cérébrales majoritairement impliquées dans la mémoire de reconnaissance d'objets et dans la mémoire de leur localisation (Buffalo et al., 2006; Mumby et al., 2002). Cependant, le degré d'implication de chacune de ces structures est différent selon le type de mémoire concerné. En effet, il a été montré que des lésions bilatérales de l'hippocampe dorsal chez le rat qui couvrent 30% à 50% du volume total hippocampique altèrent la mémoire spatiale. Le même degré de perturbation a également été observé avec des lésions couvrant 50% à 100% de l'hippocampe (Broadbent et al., 2004). De manière surprenante, la mémoire de reconnaissance est restée intacte suite à des lésions dorsales touchant 50% à 75% du volume total hippocampique et n'est endommagée que lorsque ces lésions sont plus grandes (à partir de 75%). Enfin, lorsque l'hippocampe ventral est lésé d'environ 50%, seule la mémoire spatiale est affectée (Broadbent et al., 2004). D'autres études d'imagerie fonctionnelle par résonance magnétique réalisées au niveau du lobe temporal médian (incluant le cortex entorhinal, périrhinal et parahippocampique) de onze personnes consentantes ont permis de mettre en évidence le rôle des deux dernières structures citées dans la mémoire de reconnaissance et de la localisation d'objet. Les résultats ont révélé que chez ces onze sujets, le cortex périrhinal était activé pendant les tests mesurant les deux types de mémoire. Le cortex parahippocampique impliquait seulement la mémoire spatiale (Buffalo et al., 2006). Ainsi, il apparaît clairement que la mémoire de reconnaissance et la mémoire de la localisation d'objet sont gouvernées par des régions cérébrales bien spécifiques et qu'elles sont par conséquent contrôlées par des voies moléculaires bien distinctes. Ici, la L41 semble agir sur une voie propre à la mémoire de reconnaissance. Afin de vérifier cela, il faudrait reprendre les expériences d'IRM fonctionnelle de l'étude précédemment mentionnée, sur des souris *Tg(Dyrk1a)* traitées ou non à la L41 et contrôles, et en ajoutant la zone hippocampique dans l'analyse. Si les structures cérébrales spécifiques à la mémoire de reconnaissance sont

effectivement altérées chez les animaux transgéniques puis corrigées par la L41, il serait intéressant d'effectuer ensuite une étude de comparaison du profil d'expression de gènes et de phosphorylation des protéines, entre les structures propres à chacune des deux mémoires. Cela permettrait de disséquer les différentes voies moléculaires spécifiques à chaque mémoire et donc de mieux comprendre quel est le mécanisme biologique restauré par la L41 qui a permis la correction des fonctions cognitives des souris trisomiques dans le test de la reconnaissance d'objet.

L'accumulation des conséquences de la L41 sur les mécanismes biologiques est nécessaire à la restauration de la mémoire de reconnaissance

Les différentes expériences de pharmacocinétique, de bio-distribution, de durée de traitement et de rémanence nous ont permis de mieux caractériser le mode d'action de notre inhibiteur de DYRK1A. En effet, l'administration quotidienne de L41 (20 mg/kg) pendant des durées croissantes a révélé que l'effet de correction cognitive de la drogue apparaissait seulement à partir de 12 jours d'injections quotidiennes. Or, la pharmacocinétique a montré que le composé disparaissait totalement du cerveau au bout de 2 h. De plus, la disparition complète de l'effet inhibiteur est observable à 48 h après la dernière injection au 19^{ème} jour. Ceci signifie que la restauration mnésique observée dans nos modèles de trisomie partielle et transgéniques pour DYRK1A ne provient pas d'une accumulation de la drogue elle-même mais plutôt d'un cumul, pendant au moins 12 jours, des conséquences de l'inhibition de DYRK1A sur les processus biologiques de ces animaux.

Nous savons déjà que la L41 est efficace dès 12 jours de traitement sur la correction des déficits mnésiques des animaux trisomiques. Un point qui restera à éclaircir est la rémanence de ces processus cognitifs rétablis par la L41 à partir de 48 h après l'arrêt du traitement. Cette dernière donnée manquante permettrait de proposer un mode d'administration plus précis de la molécule tel que la possibilité ou non de fractionner les périodes de traitement. Ainsi par exemple, la drogue peut-elle être administrée un jour sur deux, ou la dose quotidienne unique peut-elle être fractionnée en deux demi-doses administrées à 12 h d'intervalle ?

L'activité catalytique de DYRK1A physiologique basale est insensible à la L41

De manière surprenante, les animaux contrôles traités avec la L41 ne sont pas affectés par la drogue, ni dans leur comportement vis-à-vis du test de la reconnaissance d'objet, ni au niveau de l'activité kinase de DYRK1A. De plus, il semblerait que la molécule inhibe uniquement l'activité de la kinase en excès chez les animaux trisomiques. Il semble que ce fait ne soit pas lié à la dose de L41 administrée aux animaux contrôles. En effet, l'étude de dose réponse a montré que l'activité kinase physiologique ne variait pas malgré des concentrations élevées en L41 qui sont capables d'inhiber la DYRK1A surnuméraire et corriger les effets cognitifs. Ceci n'est pas non plus causé par une bio-distribution différentielle du composé dans les souris transgéniques par rapport aux sauvages puisque le dosage de la L41, à la fois dans le plasma et dans le cerveau, est le même pour les deux génotypes. En revanche, la question d'une distribution différentielle se pose clairement à l'échelle subcellulaire. En effet, nous avons montré que DYRK1A est à la fois exprimée au niveau cytoplasmique et nucléaire dans les souris Tg(*Dyrk1a*) et sauvages. Le dosage de la L41 dans ces compartiments a révélé de manière intéressante et inattendue, une concentration moindre d'un facteur 1.5 du composé dans le cytoplasme des souris contrôles par rapport aux transgéniques. La concentration en L41 cytoplasmique située à environ 1.40 nM dans le cytoplasme des cerveaux de souris sauvages, pourrait être insuffisante pour inhiber l'activité catalytique physiologique de DYRK1A. Ceci expliquerait également que chez les transgéniques, la drogue normalise l'activité kinase de DYRK1A à un taux similaire à celle des souris sauvages et n'induirait pas une diminution à un niveau inférieur à celui-ci. Cependant il est plus probable que la DYRK1A native, basale occupe un compartiment cellulaire différent ou elle est associée à des protéines différentes par rapport à la DYRK1A surnuméraire. Sa localisation différente et/ou ses protéines associées différentes la protégerait « physiquement » de la L41. Il semble que la L41 n'ait pas accès à la DYRK1A native, basale. L'étude comparée des différentes « populations » de DYRK1A (localisation intracellulaires, protéines associées) devrait contribuer (1) à comprendre les causes des effets physiologiques majeurs liés à la présence d'une copie supplémentaire du gène de DYRK1A, et d'une concentration globale de la kinase multipliée par un simple facteur 1,5 et (2) à bien cibler de futurs inhibiteurs thérapeutiques.

On peut remarquer que l'expression de DYRK1A dans les compartiments cytoplasmique + synaptosome et nucléaire est similaire au profil de concentrations de la L41 dans différents compartiments cellulaires. Cela suggère que la L41 dosée correspondrait proportionnellement

à la quantité de DYRK1A présente dans l'échantillon. Afin de vérifier si la L41 dosée est celle qui est restée accrochée à DYRK1A, un dosage de la L41 à partir de DYRK1A immunoprécipitée serait envisageable. Si c'est le cas, il serait intéressant de confirmer cela par le dosage de la molécule dans des animaux hétérozygotes pour *Dyrk1a*. Enfin, ce dosage réalisé dans des souris « kinase dead » possédant un allèle muté sur la Lys188 du domaine kinase de DYRK1A et dont l'activité est réduite de moitié, permettrait de mettre en évidence l'importance du domaine catalytique dans la liaison de la L41.

De la L41 au candidat médicament

En comparaison avec les autres inhibiteurs de DYRK1A décrits dans la littérature, les dérivés de la Leucettine 41 pourraient être la drogue la plus sûre d'emploi au niveau de sa toxicité ainsi que de sa spécificité dans l'action inhibitrice de DYRK1A (cf partie 1.10.3 de l'introduction pour la description des principaux défauts des autres inhibiteurs). En effet, contrairement à la molécule CX-4945, la structure chimique de la L41 est bien différente de celle de l'Harimine dont on connaît ses effets néfastes et dangereux sur la régulation de la cognition. De plus, elle ne possède pas cette multitude de cibles comme c'est le cas pour l'EGCG, conférant ainsi une spécificité vis-à-vis de DYRK1A supérieure à cette dernière. Bien que la L41 soit capable de corriger les déficits cognitifs liés à la mémoire de reconnaissance des animaux trisomiques, elle présente néanmoins quelques aspects à améliorer afin de parvenir au candidat médicament.

Le premier étant son interaction avec les récepteurs aux cannabinoïdes CB1. Une activation de ces récepteurs peut entraîner une réponse cognitive mais comme présenté dans l'introduction, une interaction anormale à long terme induit des désordres psychiatriques. Nous avons montré qu'un traitement avec la L71, un dérivé de la L41 qui inhibe DYRK1A sans activité sur les récepteurs CB1, était capable de restaurer les performances mnésiques des souris Tg(*Dyrk1a*). La Leucettine L3, un composé aux propriétés opposées (interaction avec CB1, mais pas d'inhibition de DYRK1A), est incapable de corriger les déficits cognitifs. Ces résultats qui confirment que la correction cognitive est bien due à une inhibition spécifique de l'activité de DYRK1A sans impliquer les récepteurs aux cannabinoïdes, encouragent à poursuivre la recherche d'inhibiteurs de DYRK1A dérivés de la L41 et dépourvus d'activité sur les récepteurs CB1.

Le second défaut de la L41 est son incapacité à passer la barrière intestinale. Elle devait alors être injectée par voie intrapéritonéale. Le candidat médicament devra donc pouvoir franchir la barrière intestinale en plus de la barrière hémato-encéphalique, afin d'être administrable par voie orale. Une fois le candidat-médicament identifié, il sera ensuite nécessaire de réitérer la batterie de tests pharmacologiques, biochimiques et comportementaux dans un autre modèle animal tel que le rat par exemple. A ce moment-là, si tous les critères d'absorption, de distribution, de métabolisme, d'excrétion, de toxicité, d'innocuité sont validés, alors des tests en phase préclinique réglementaire et clinique pourront être envisagés.

Traitement à la L41 durant le développement

De manière générale, il est important de bien déterminer la fenêtre thérapeutique du futur candidat médicament. Par exemple, il a été montré que les effets bénéfiques de l'EGCG et leur rémanence dépendaient de la période à laquelle le traitement est donné. Ainsi, une administration par gavage de la mère de ce composé en prénatal (au 7^{ème} et 8^{ème} jour embryonnaire) permettait d'améliorer de manière définitive la morphologie cranio-faciale des souris trisomiques Ts65Dn (McElyea et al., 2016). De plus, certains phénotype cognitifs ont été corrigés suite à une administration chronique de l'EGCG à des souris sur-exprimant *Dyrk1a*, les Tg(CEPHY152F7)12Hgc, durant la gestation et jusqu'à l'âge de trois mois. Ces corrections impliquaient une réduction du volume cérébral et notamment du thalamus-hypothalamus ainsi qu'une restauration de la mémoire de reconnaissance à long terme (Guedj et al., 2009). Des nouveaux nés Ts65Dn recevant un traitement sous-cutané entre le 3^{ème} et le 15^{ème} jour présentaient une restauration totale de la neurogenèse, du nombre de cellules granulaires hippocampiques ainsi que du taux de protéines pré- et post-synaptiques au niveau de l'hippocampe, du gyrus denté et du cortex. Cependant, la correction de ces phénotypes n'ont pas perduré et disparaissaient déjà au bout d'un mois après l'arrêt du traitement. Ce qui était confirmé par les déficits présents au niveau de leur mémoire spatiale et mémoire de travail (Stagni et al., 2016). Une administration pendant un mois de l'EGCG dans l'eau de boisson à des souris Ts65Dn et Tg(MT1A-*Dyrk1a*) à l'âge adulte (3 mois) améliorait leur mémoire spatiale et leur mémoire de reconnaissance (Torre et al., 2014). En revanche, lorsque les Ts65Dn recevaient ce traitement dans l'eau de boisson pendant trois semaines à partir du 21^{ème} ou 24^{ème} jour postnatal, correspondant à la phase d'adolescence, aucune restauration dans les tâches d'apprentissage ni dans la mémorisation spatiale et de reconnaissance n'a pu être

observée (Stringer et al., 2015, 2017). Les effets plus ou moins bénéfiques obtenus avec cette molécule est donc fortement dépendante de l'âge auquel elle est administrée.

Dans notre projet, nous n'avons traité que des modèles murins à un âge adulte, quand le cerveau est déjà totalement mature. Or, comme suggèrent les résultats relatés précédemment, il semblerait qu'un traitement anténatal serait l'approche la plus efficace afin d'assurer une correction des phénotypes associés au SD et leur rémanence. Aussi, puisque DYRK1A joue un rôle majeur dans le développement cérébral et l'établissement du réseau neuronal, il serait donc intéressant d'envisager un traitement précoce à la Leucettine durant le développement chez nos modèles de trisomie afin de vérifier si la drogue est capable de restaurer la neurogenèse. Ainsi, plutôt que de normaliser les conséquences sur les performances intellectuelles engendrées par le surdosage de DYRK1A à l'âge adulte, un traitement pendant le développement fœtal pourrait corriger, peut-être de manière définitive une partie, voire l'ensemble des déficits cognitifs liés au SD. Pour qu'une telle perspective puisse être réalisée, il faudra d'abord s'assurer en amont que la drogue traverse bien la barrière placentaire. Un traitement in-utero pourrait également limiter les questions éthiques soulevées par les parents d'enfants atteints de ce syndrome. En effet, des chercheurs canadiens ont exploré la manière dont les parents percevaient la possibilité de traiter leur enfant en post-natal, dans le but de diminuer les altérations mnésiques provoquées par la trisomie (Inglis et al., 2014). Ce sondage a révélé que deux-tiers des participants déclaraient être favorables à une telle initiative puisqu'elle permettrait d'améliorer la qualité de vie de l'enfant et celle d'eux-mêmes. En revanche, une minorité s'inquiétait des conséquences que le traitement pourrait avoir sur la personnalité de l'enfant. Or cette appréhension sur les risques de changement de personnalité n'aurait plus lieu d'être si le traitement était appliqué avant la naissance. Enfin, la thérapie précoce peut également s'avérer être une solution réconfortante pour les couples pour lesquels l'avortement constitue un réel dilemme.

Autres applications de la L41

Outre ses capacités à restaurer les performances cognitives des animaux trisomiques, la L41 a également été décrite pour ses effets neuro-protecteurs notamment contre la neuro-dégénérescence induite par la protéine APP telle qu'observée dans des modèles animaux de maladie d'Alzheimer (Tahtouh et al., 2012; Naert et al., 2015). Il apparaît donc intéressant de tester la L41 dans le cadre du déclin cognitif associé à cette maladie dans des modèles murins sur-exprimant APP par exemple. Rappelons que les personnes atteintes du syndrome de Down

sur-expriment ce gène APP présent sur le chromosome 21, et sont donc avec l'âge, souvent sujets au développement de cette pathologie. Ainsi, les patients atteints de cette démence mais également les individus porteurs de la T21 développant Alzheimer, pourraient tirer bénéfice de la L41 ou de façon plus large, d'un inhibiteur pharmacologique de DYRK1A.

Un traitement à la L41 sur des cellules hippocampiques de souris HT22 et des cellules d'ostéosarcomes U-2 OS a révélé un autre effet inattendu de la drogue : l'activation de l'autophagie induite par l'inhibition de la protéine CDC-like kinase CLK1 (Fant et al., 2014). L'utilisation de la L41 peut donc s'avérer bénéfique dans des cas de cancer où l'autophagie est indispensable à la régression tumorale (Liang et al., 1999), ou encore contre la neuro-dégénérescence où cette activité protège de l'agrégation de polyglutamines dans la maladie de Huntington (Ravikumar et al., 2002). Une réduction des capacités autophagiques est d'ailleurs observée au cours du développement de la maladie d'Alzheimer (références dans Fant et al., 2014).

Mécanismes biologiques sous-jacents aux déficits mnésiques observés dans les modèles murins de la T21

Les cinq phosphoprotéines communes aux modèles Tg(*Dyrk1a*) et Ts65Dn et aux trois régions du cerveau (hippocampe, cortex, cervelet) mises en évidence dans l'analyse phospho-protéomique.

Les analyses du phosphoprotéome ont permis de mettre en évidence 5 phosphoprotéines partagées par les modèles Tg(*Dyrk1a*) et les Ts65Dn et qui sont communes à l'hippocampe, au cortex et au cervelet : MAP1A, MAP1B, MAP2, PICCOLO et SYNAPSINE-1. La phosphorylation de ces protéines est significativement modulée par la condition trisomique et est sensible au traitement à la L41. La SYNAPSINE-1 a fait l'objet d'une étude plus approfondie dans ce projet car le peptide phosphorylé correspondant était le seul à posséder un site de phosphorylation appartenant à une séquence consensus de DYRK1A. De plus cette protéine présentait une hyper-phosphorylation associée à la surexpression de DYRK1A, et une déphosphorylation suite au traitement à la L41. Et nous avons démontré que la SYN-1 est phosphorylable par DYRK1A sur son résidu Ser551 *in vitro*. Les autres protéines sont également intéressantes puisque MAP1A, MAP1B et MAP2 sont phosphorylées par DYRK1A (Murakami et al., 2012; Scales et al., 2009). Cependant, les sites de phosphorylation par DYRK1A sur ces protéines décrits dans ces travaux (MAP1A : Thr2059, MAP1B : Ser1392, MAP2 : résidu non identifié) ne correspondent à aucun des sites identifiés dans le phosphoprotéome. Il se pourrait donc que DYRK1A puisse phosphoryler ces trois protéines sur d'autres résidus dans une séquence différente de la séquence consensus théorique. En effet, DYRK1A phosphoryle certains substrats au sein d'une séquence non consensus, tel que le facteur d'épissage SF3b1/SAP155 (L-T-A-⁽⁴³⁴⁾T-P) (Graaf et al., 2006). En outre, DYRK1A est capable de phosphoryler une même cible sur plusieurs résidus différents. C'est le cas de la protéine Tau par exemple, dont on connaît maintenant 11 sites de phosphorylation par DYRK1A (Liu et al., 2008). En tous les cas, l'émergence de ces 3 protéines conforte la pertinence de notre étude phosphoprotéomique et confirme le rôle de DYRK1A dans les processus de morphogenèse dendritique et de régulation des microtubules (Ori-McKenney et al., 2016).

La dernière des 5 protéines communes, PICCOLO, est une protéine de la matrice du cytosquelette associée à la zone active présynaptique (Cases-Langhoff et al., 1996). Elle joue un rôle de protéine d'échafaudage impliquée dans l'endocytose et l'exocytose des vésicules présynaptiques (Fenster et al., 2003; Garner et al., 2000). La suppression de son expression dans le cerveau humain a conduit à une perte dramatique de cellules neuronales accompagnée d'une hypoplasie ponto-cérébelleuse de type 3 caractérisée par une atrophie du cervelet avec une microcéphalie progressive (Ahmed et al., 2015). De plus, l'inhibition de l'expression de PCLO dans des cultures de neurones hippocampiques induit une dispersion de la SYN-1A en dehors du bouton présynaptique et donc une augmentation de l'exocytose vésiculaire (Leal-Ortiz et al., 2008). Cette dispersion s'explique par la diminution dans l'assemblage des filaments d'actine sur lesquels SYN-1 exerce son ancrage pour maintenir le pool de réserve vésiculaire (Waites et al., 2011). En régulant le relargage des neurotransmetteurs par le contrôle de l'assemblage des filaments d'actine présynaptiques, PCLO joue donc son rôle en amont de la SYN-1 et peut donc influencer l'activité de cette dernière. Ainsi, la diminution des vésicules du pool de réserve observé en microscopie électronique au niveau de l'hippocampe des animaux *Tg(Dyrk1a)* pourrait être causée par une altération du rôle de PCLO suite à une phosphorylation anormale sur la protéine. En effet, une étude récente du phosphoprotéome ciblée sur des synaptosomes de rats, préalablement stimulés électriquement, a révélé que PCLO était la 2^{ème} protéine (derrière la protéine BASSOON) à être massivement phosphorylée sur 31 sites différents, suite à la dépolarisation (ces sites diffèrent de ceux retrouvés modulés dans notre analyse phosphoprotéomique). A noter que seulement 18 sites ont été identifiés pour SYN-1, dont la Ser549, Ser551 et Ser682 également retrouvées dérégulées dans notre étude phosphoprotéomique (**Figure 40**). Ce qui indique que les événements de phosphorylation sur PCLO sont étroitement liés avec l'exocytose vésiculaire (Kohansal-Nodehi et al., 2016). Les perspectives expérimentales pour vérifier cette hypothèse seront discutées un peu plus tard dans ce chapitre.

Tg(*Dyrk1a*) Ts65Dn Both

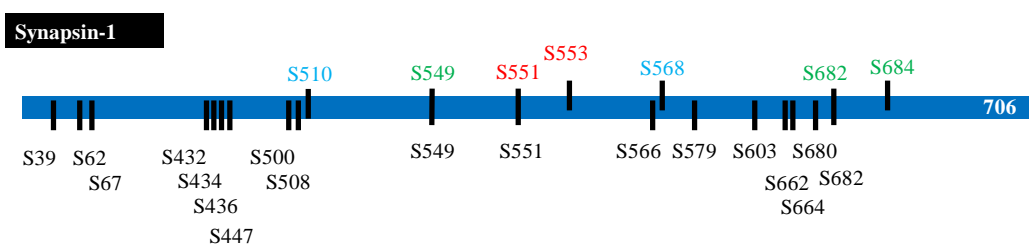
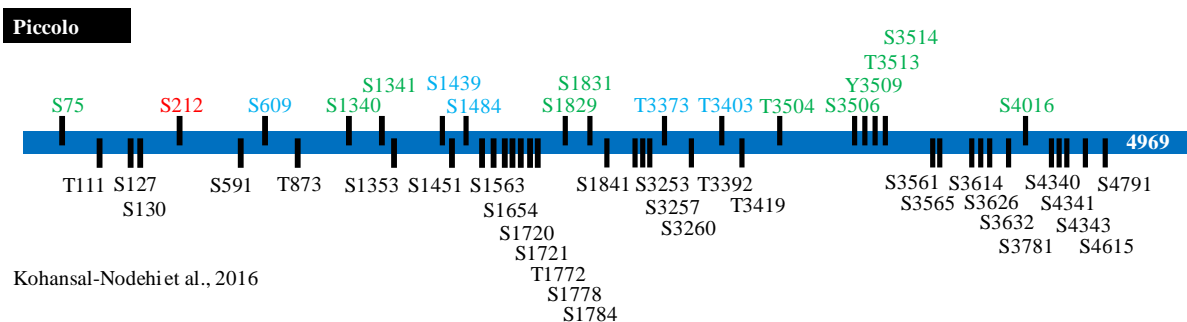


Figure 40. Comparaison des sites phosphorylés dans Piccolo et Synapsin-1 dans notre analyse phosphoprotéomique avec ceux de l'étude de Kohansal-Nodehi et al., 2016. Les résidus en rouge, bleu et vert représentent les sites modulés dans les souris Tg(*Dyrk1a*), dans les Ts65Dn et communément dans les deux modèles respectivement. En noir les sites décrits dans Kohansal-Nodehi et al., 2016.

SYNAPSINE 1, une nouvelle cible de DYRK1A

Comme démontré précédemment, DYRK1A est capable d'interagir directement avec SYN-1. Cette protéine de la présynapse est impliquée dans le maintien du pool de réserve des vésicules synaptiques en les retenant au niveau du cytosquelette d'actine (Benfenati et al., 1991). Lorsqu'elle est phosphorylée par différentes kinases telles que la CAMK2, son interaction avec le cytosquelette d'actine se rompt, permettant ainsi la libération des vésicules vers la zone active présynaptique (Llinás et al., 1991). Il apparaît donc clairement que le relargage des neurotransmetteurs est dépendante de la phosphorylation de SYN-1. Nous avons montré que SYN-1 est directement phosphorylée par DYRK1A sur son résidu Ser551. Il faut noter que cette nouvelle interaction était jusqu'à présent inconnue dans la littérature, elle met en lumière un nouveau rôle de la kinase dans le contrôle du trafic des vésicules présynaptiques dépendante de SYN-1.

En dehors de son rôle physiologique dans la régulation de la plasticité synaptique, SYN-1 a également été associée aux phénomènes d'épilepsie. Dans ce cas pathologique, elle a été identifiée pour la première fois lors d'une étude réalisée sur une famille de quatre générations dont certains membres, uniquement de sexe masculin, présentaient soit des troubles épileptiques seuls, soit accompagnés d'une macrocéphalie, d'une altération cognitive ou encore d'un comportement agressif (Garcia et al., 2004). Les chercheurs ont découvert une mutation non-sens (W356X) sur le gène codant la SYN-1 qui était présente chez tous les hommes affectés et les femmes porteuses, et qui ségrégeait avec le chromosome X de manière récessive dans les générations suivantes. L'implication de la SYN-1 dans l'épilepsie a été confortée plus tard par la découverte d'autres mutations non-sens (Q555X) et faux sens (A51G, A550T, T567A) sur quatre générations d'une famille franco-canadienne dans laquelle des cas épileptiques et autistiques ont pu être diagnostiqués (Fassio et al., 2011). Ces mutations ont lieu au niveau de domaines importants de la protéine pour la phosphorylation de SYN-1 essentielle à son rôle de régulation du pool vésiculaire présynaptique (**Figure 41**). La perturbation des niveaux de phosphorylation de la protéine entraînant une altération de l'homéostasie synaptique peut ainsi être à l'origine des phénomènes épileptiques. En effet, Fassio et al. (2011) ont démontré que ces mutations non-sens et faux sens conduisaient à une diminution de la taille et du trafic du pool vésiculaire associée à une altération de la phosphorylation par les kinases MAPK/Erk et de la croissance neuritique.

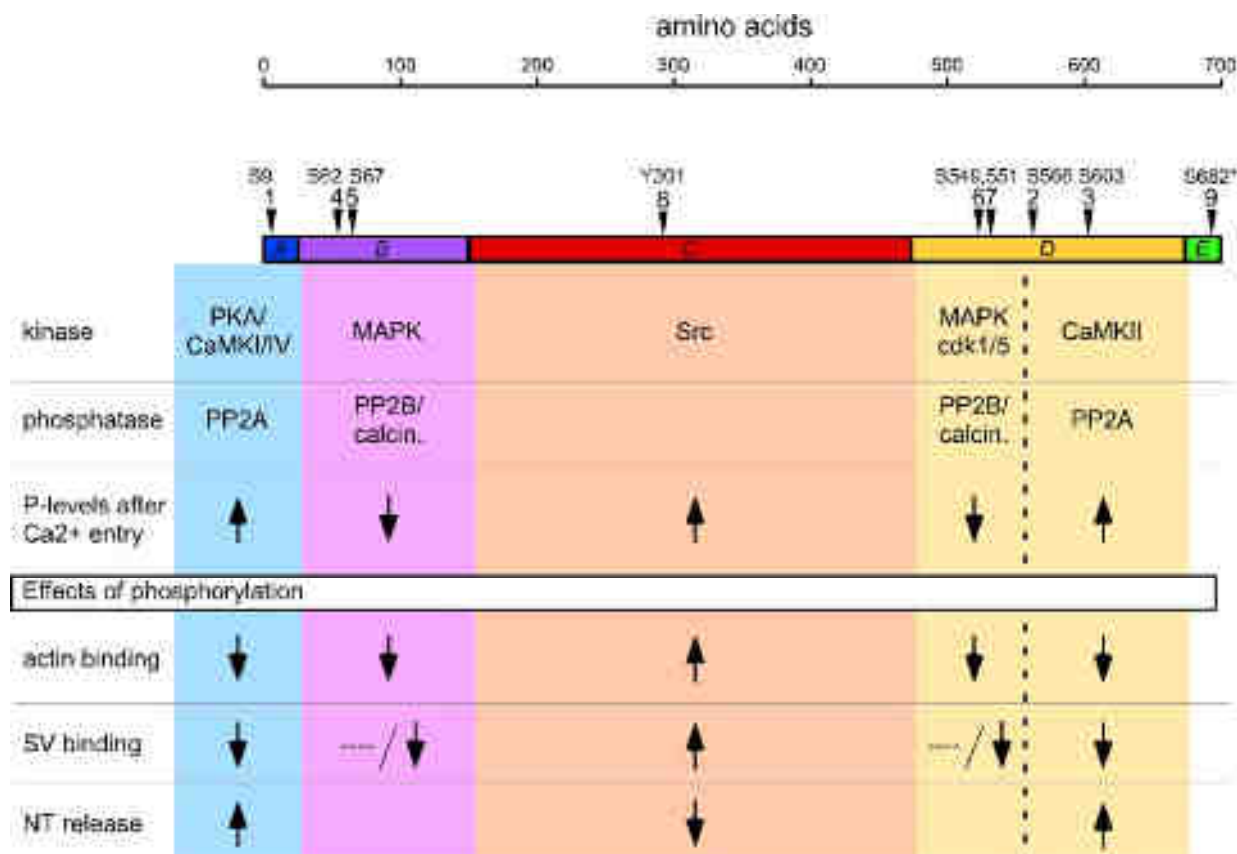


Figure 41. Sites de phosphorylation connus de la SYN-1 chez le rat. Description des kinases et phosphatases ciblant SYN-1 et conséquences des phosphorylation/déphosphorylation sur l'association de SYN-1 au cytosquelette d'actine, la libération vésiculaire du pool de réserve présynaptique et le relargage des neurotransmetteurs (Cesca et al., 2010) .

L'épilepsie, associée la plupart du temps à une microcéphalie ou encore à un retard mental, a été rapportée dans plusieurs cas de patients qui exprimaient une haploinsuffisance pour *Dyrk1a* (MRD7) (Courcet et al., 2012; Møller et al., 2008; Oegema et al., 2010; Valetto et al., 2012; Yamamoto et al., 2011). Ceci pourrait signifier que SYN-1 est dérégulée lorsque l'expression de DYRK1A est réduite de moitié et que ces deux protéines sont fonctionnellement liées. Ces données corroborent donc nos résultats à savoir l'interaction directe de DYRK1A avec SYN-1. Bien qu'aucune information ne soit disponible quant à la fréquence des cas épileptique potentiellement observables dans les modèles de trisomie utilisés durant notre projet, il est à noter que dans la population touchée par la T21 la fréquence des cas d'épilepsie se situe entre 1,4 et 17 % contre 1% pour la population générale et qu'elle augmente avec l'âge (Illingworth, 1959; Johannsen et al., 1996; Prasher, 1995).

Diminution du nombre de vésicules présynaptiques dans l'hippocampe des souris Tg(*Dyrk1a*)

Des travaux antérieurs réalisés sur des cultures de neurones hippocampiques issus de souris possédant une trisomie partielle, les Ts65Dn, complètent nos résultats dans l'analyse ultra-structurale présynaptique (Marland et al., 2016). En effet, les chercheurs n'ont observé aucun changement dans le nombre de vésicules du pool de réserve dans ces cultures. Leur modèle expérimental utilisé suppose un recyclage des vésicules provenant de boutons terminaux exclusivement hippocampiques. Or, dans le cerveau entier, l'hippocampe reçoit deux principales voies afférentes permettant le transfert de l'information depuis le cortex entorhinal vers l'hippocampe : la voie trisynaptique et la voie monosynaptique temporoammonique (Coulter et al., 2011; Witter and Amaral, 1991). La voie trisynaptique débute dans la couche II du cortex entorhinal qui projette ses axones vers le gyrus denté (voie perforante) et la région du CA3 à partir de laquelle d'autres axones, les collatérales de Schaeffer, font synapses dans la région du CA1. Tandis que la voie monosynaptique temporoammonique sollicite plutôt les axones de la couche III du cortex entorhinal qui transmettent l'information directement vers le CA1 (**Figure 42**).

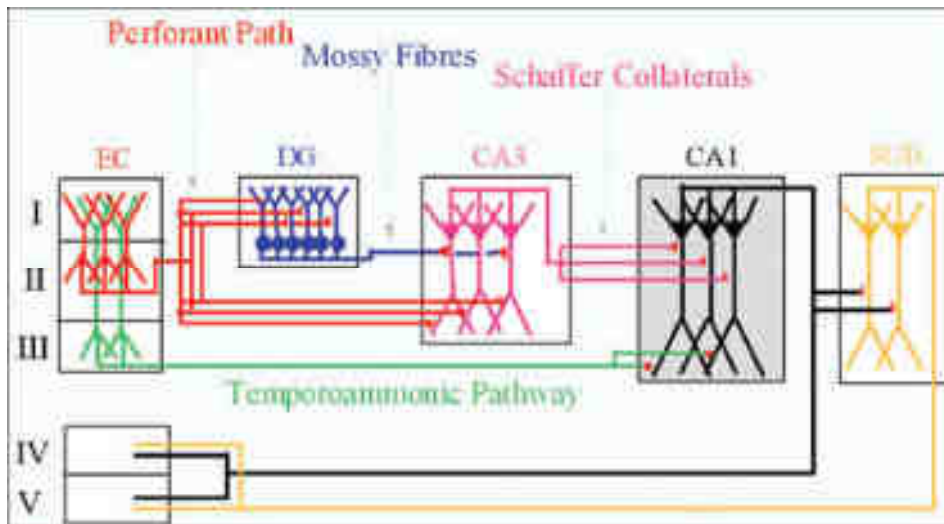


Figure 42. Schéma des connectivités cortico-hippocampiques. La voie trisynaptique (couche II EC – DG – CA3 – CA1) et la voie temporoammonique (couche III EC – CA1) constituent les voies afférentes corticales principales de l'hippocampe. Les neurones du CA1 et du SUB envoient à leur tour l'information vers la couche IV et V du EC. EC : cortex entorhinal, DG : gyrus denté, SUB: subiculum. (Coulter et al., 2011)

Dans notre analyse ultra-structurale des synapses, les vésicules présynaptiques quantifiées provenaient exclusivement du cortex pour la région du gyrus denté. En effet, pour la région du CA3, il a fallu trier les présynapses observées puisque les axones afférents proviennent non seulement du cortex entorhinal mais également du gyrus denté (dont les axones correspondant sont appelés les fibres moussues) et de la région CA3 contra-latérale. La différence entre la présynapse d'une fibre moussue et celle d'un axone typique est basée sur sa morphologie assez particulière, c'est à dire très large pouvant atteindre jusqu'à 100 fois la taille d'un bouton terminal typique, et sur la présence de plusieurs zones actives pour une même présynapse. Pour discriminer l'axone cortical de l'axone contra-latéral, il a fallu se focaliser sur la couche cellulaire correspondante. En effet, il a été décrit que les axones corticaux se projettent uniquement dans la couche *stratum lacunosum-moleculare*, tandis que les axones du CA3 font synapses plutôt dans la couche *stratum radiatum* (Kajiwara et al., 2008) (**Figure 43**). Puisque les neurones pyramidaux du CA3 sont caractérisés par des axones strictement non-myélinisés, la couche *stratum lacunosum-moleculare* d'intérêt est donc facilement reconnaissable grâce à la présence d'axones entourés de myéline (Duigou et al., 2013). Nous avons utilisé le même raisonnement pour la région du CA1 qui reçoit également les afférents du CA3. La réduction

du nombre de vésicules présynaptiques détectée chez les animaux transgéniques a donc lieu principalement dans les boutons présynaptiques des neurones du cortex entorhinal, tandis que la densité des vésicules présynaptiques des régions hippocampiques ne semble pas être affectée selon Marland et al. (2016). Effectuer à nouveau la quantification des vésicules présynaptiques au niveau des axones hippocampiques et répéter les expériences de Marland et al. (2016) dans des cultures de neurones corticaux de la région entorhinale pourrait confirmer cela.

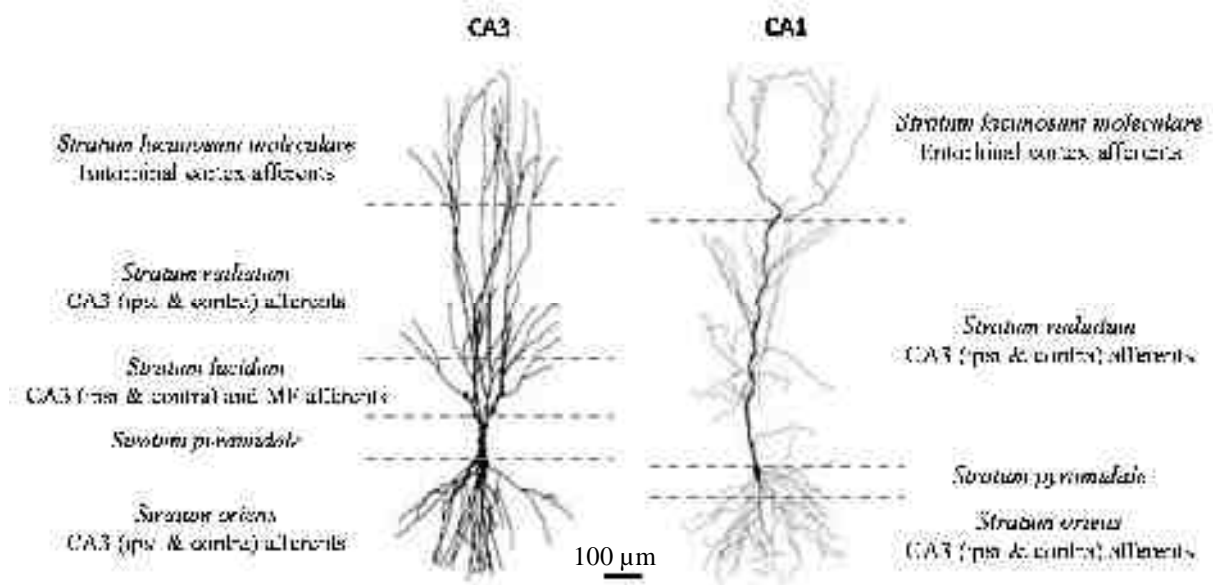


Figure 43. Représentation des différentes couches des structures du CA3 et CA1 hippocampiques. MF Mossy Fibers. Adapté de Ishizuka et al., 1995; Spruston, 2008.

Une différence entre le cortex entorhinal et l'hippocampe réside dans les divers types neuronaux qui peuplent chaque région cérébrale. En effet au niveau cortical, les couches II et III sont principalement constituées de neurones étoilés et de neurones pyramidaux, avec une dominance de cellules étoilées dans la couche II (Canto et al., 2008; Klink and Alonso, 1997). Dans l'hippocampe, le gyrus denté est essentiellement composé de cellules granulaires et les régions du CA1 et CA2, de neurones pyramidaux. Ces trois types de neurones possèdent chacun une morphologie bien particulière. Il en est de même pour les cellules pyramidales de la couche II et III du cortex entorhinal et des régions du CA1 et CA3 qui ne partagent pas la même structure (**Figure 44**).

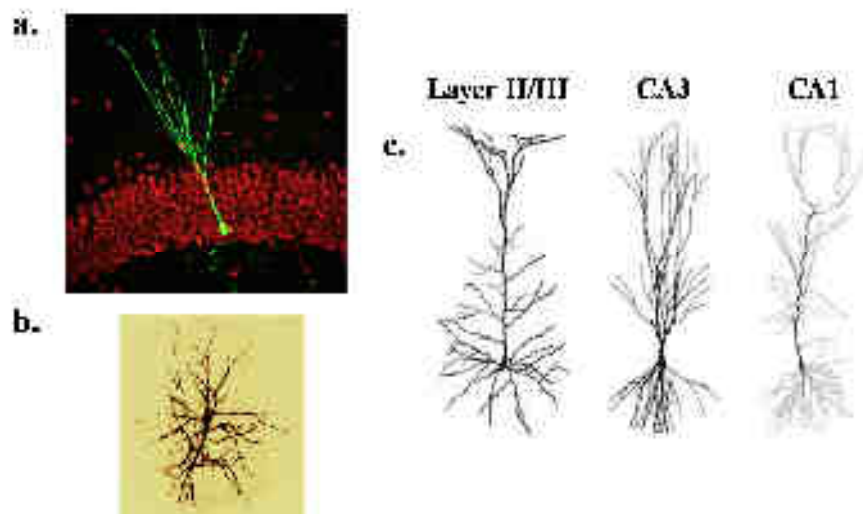


Figure 44. Structures (a.) d'un neurone granulaire du gyrus denté, (b.) d'un neurone étoilé du cortex entorhinal et (c.) de neurones pyramidaux de la couche II et III du cortex entorhinal et des régions CA3 et CA1 hippocampiques. (Jason Snyder ; Michael N. Economo ; Spruston et al.)

Cela sous-entend que ces neurones sont contrôlés par des voies moléculaires distinctes et qu'ils diffèrent par conséquent dans leurs fonctions. En effet, il a été montré que suite à une stimulation électrique à haute fréquence, les neurones de la voie temporoammonique-CA1 étaient capables de répondre avec une LTP dont la persistance était nettement plus élevée que celle des collatérales de Schaeffer-CA1 (Aksoy-Aksel and Manahan-Vaughan, 2013). Cette différence fonctionnelle peut ainsi amener à envisager que les neurones du cortex entorhinal diffèrent d'un point de vue moléculaire par rapport aux neurones hippocampiques. Il a d'ailleurs déjà été montré qu'au sein même de l'hippocampe, les neurones pyramidaux du CA1 et du CA3 présentaient des différences dans leur profil d'expression génique. Dans l'étude correspondante, l'analyse des cellules pyramidales isolées des deux zones d'intérêt à partir de 6 échantillons humains, ont révélé 12 gènes qui étaient significativement surexprimés dans les cellules du CA1 par rapport à celles du CA3. Il s'agissait de gènes codant pour des récepteurs membranaires tels que les récepteurs du GABA (GABRA1 et GABRA2) ou encore des gènes codant pour les sous-unités NR1 et NR2B des récepteurs NMDA. De plus, une augmentation du taux d'ARNm a également été observée pour des protéines de régulation du cytosquelette telles que COX2 (cyclooxygénase 2) ou encore une protéine de l'endosome EEA1. A l'inverse,

les neurones pyramidaux du CA3 exprimaient 8 gènes de façon augmentée significativement par rapport aux neurones du CA1 tels que les gènes codant pour les récepteurs GLUR1 et GLUR2 ou encore ceux codant pour les éléments du cytosquelette, la β - et γ -actine et APP (Ginsberg and Che, 2005). Ces différences dans l'expression génique et fonctionnelle illustre l'implication différentielle des populations neuronales dans les processus biologiques mais également l'importance de disséquer leur identité moléculaire et fonctionnelle pour une meilleure compréhension mécanistique. Ainsi, en ce qui concerne la phosphorylation directe de SYN-1 par DYRK1A, il serait intéressant de comparer l'expression de cette protéine présynaptique dans ces différentes populations neuronales. De manière générale, il faudrait réaliser la même expérience que Ginsberg and Che (2005), en comparant cette fois-ci les neurones étoilés et pyramidaux des couches II et III du cortex entorhinal par rapport aux cellules granulaires du gyrus denté et pyramidales du CA1 et CA3 hippocampiques. Les résultats pourraient éclairer davantage le mécanisme moléculaire sous-jacent à la diminution des vésicules présynaptiques spécifique aux neurones du cortex entorhinal observée dans les animaux transgéniques.

Pool de réserve vésiculaire non restauré par la L41

Les travaux de ce projet ont montré que DYRK1A était capable de phosphoryler SYN-1 sur son résidu Ser551. Dans le phosphoprotéome des Tg(*Dyrk1a*), ce site est hyperphosphorylé par DYRK1A puis normalisé suite au traitement par la L41. Les analyses ultra-structurales ont révélé une diminution du nombre de vésicules du pool de réserve hippocampique dans les souris transgéniques. L'hypothèse émise précédemment suite à ces résultats est que l'hyper-phosphorylation de SYN-1 par DYRK1A sur Ser551 induit un relargage excessif de ces vésicules de réserve dans la zone active. Bien que la phosphorylation de la SYN-1 soit normalisée par la L41, le pool de réserve n'a pour autant pas été restauré chez les Tg(*Dyrk1a*) traitées. La cause de ce phénotype doit donc se trouver en amont de la régulation des vésicules par SYN-1. PCLO a été décrite au début de ce chapitre comme une protéine présynaptique dont le rôle est de contrôler l'assemblage des filaments d'actine. Or le cytosquelette d'actine est un élément indispensable à l'ancrage des vésicules de réserve médiée par la SYN-1. Ainsi, si la fonction de PCLO est altérée, ce réservoir vésiculaire ne peut se constituer correctement, et ceci, même si la fonction de SYN-1 a été restaurée par la L41. Dans la condition trisomique, il ne peut être exclu que la diminution du pool de réserve vésiculaire soit causée à la fois par l'altération de l'assemblage des filaments d'actine dépendante de PCLO

et par la dissociation excessive des vésicules du cytosquelette d'actine dépendante de SYN-1. Afin de valider cette hypothèse, il faudrait vérifier dans des cultures de neurones hippocampiques et corticales des Tg(*Dyrk1a*) si l'organisation du cytosquelette d'actine de la présynapse est perturbée par rapport aux contrôles. La F-actine ainsi qu'une protéine présynaptique telle que la synaptophysine seraient marquées par fluorescence et visualisées sous microscope à haute résolution comme le dSTORM (direct stochastic optical reconstruction microscopy). Puis, si ce phénotype est vérifié, il faudrait normaliser l'hyper- ou la sous-phosphorylation de PCLO dans les Tg(*Dyrk1a*) de chacun des sites identifiés dans notre analyse du phosphoprotéome et évaluer le rétablissement du cytosquelette d'actine et son impact sur le nombre de vésicules du pool de réserve.

Hypothèses sur les mécanismes synaptiques de compensation des conséquences liées à l'altération du pool de réserve vésiculaire

Comme mentionné précédemment, le traitement à la L41 n'a pas normalisé le nombre de vésicules présynaptiques dans les Tg(*Dyrk1a*). Or la molécule avait corrigé les performances mnésiques de ce modèle dans le test de la reconnaissance d'objet. Ce qui signifie que l'effet correcteur de la drogue ne passe pas par la correction du pool de réserve vésiculaire. Si l'on maintient l'hypothèse que le phénotype observé est causé par une libération excessive de ces vésicules de réserve, il peut être proposé que l'activité synaptique soit rétablie par un adressage forcé de ces vésicules solubles relarguées en excès, vers un transport rétrograde destiné à un processus de dégradation lysosomale. Ceci permettrait donc de rééquilibrer le nombre de vésicules prêtes à l'exocytose et ainsi de pallier au relargage excessif de neurotransmetteurs (**Figure 45. A.**). Pour vérifier ceci, le marquage de chaînes de lysine spécifiques à la poly-ubiquitination telle que la chaîne K48 par la technique UiFC (Ubiquitination-induced fluorescence complementation) pourrait être réalisée dans des cultures hippocampiques et corticales de souris Tg(*Dyrk1a*) traitées ou non à la L41 et contrôles et permettrait ainsi d'évaluer l'activité de protéolyse.

Deux autres hypothèses peuvent être émises quant à la diminution des vésicules présynaptiques de réserve. Il pourrait y avoir une diminution en amont, soit de la génération des vésicules au sein du réticulum endoplasmique, soit de la vitesse d'acheminement des vésicules le long des microtubules. Sur cette base théorique, le faible nombre de vésicules disponibles à la présynapse pourrait être soit compensé par une normalisation de la production vésiculaire ou

par le rétablissement de la vitesse du transport vésiculaire. Une quantité suffisante de vésicules au bouton terminal serait donc assurée et celles-ci seraient alors adressées directement à la zone active sans alimenter le pool de réserve (**Figure 45 B. et C.**). Afin de vérifier si la production vésiculaire est altérée chez les *Tg(Dyrk1a)* puis normalisée par la L41, il faudrait quantifier dans des cultures de neurones hippocampiques et corticales de souris *Tg(Dyrk1a)* traitées ou non par la L41 et contrôles, les vésicules nouvellement produites par le réticulum endoplasmique à l'étape où elles cheminent vers l'appareil de Golgi. Ceci est possible en marquant les protéines COPII qui sont des coatomères spécifiques du transport antérograde des protéines du RE vers le Golgi, ainsi qu'un marqueur synaptique vésiculaire présent depuis le RE telle que la Synaptobrevine. Enfin, pour évaluer la vitesse de transport vésiculaire le long des microtubules, une étude du transport axonal en chambre microfluidique pourrait être envisagée à partir de neurones hippocampiques et corticales d'animaux transgéniques traitées ou non à la L41 et contrôles. En marquant la Synaptobrevine, il serait possible de suivre l'acheminement des vésicules le long des axones et mesurer leur vitesse de transport et voir l'impact de la L41.

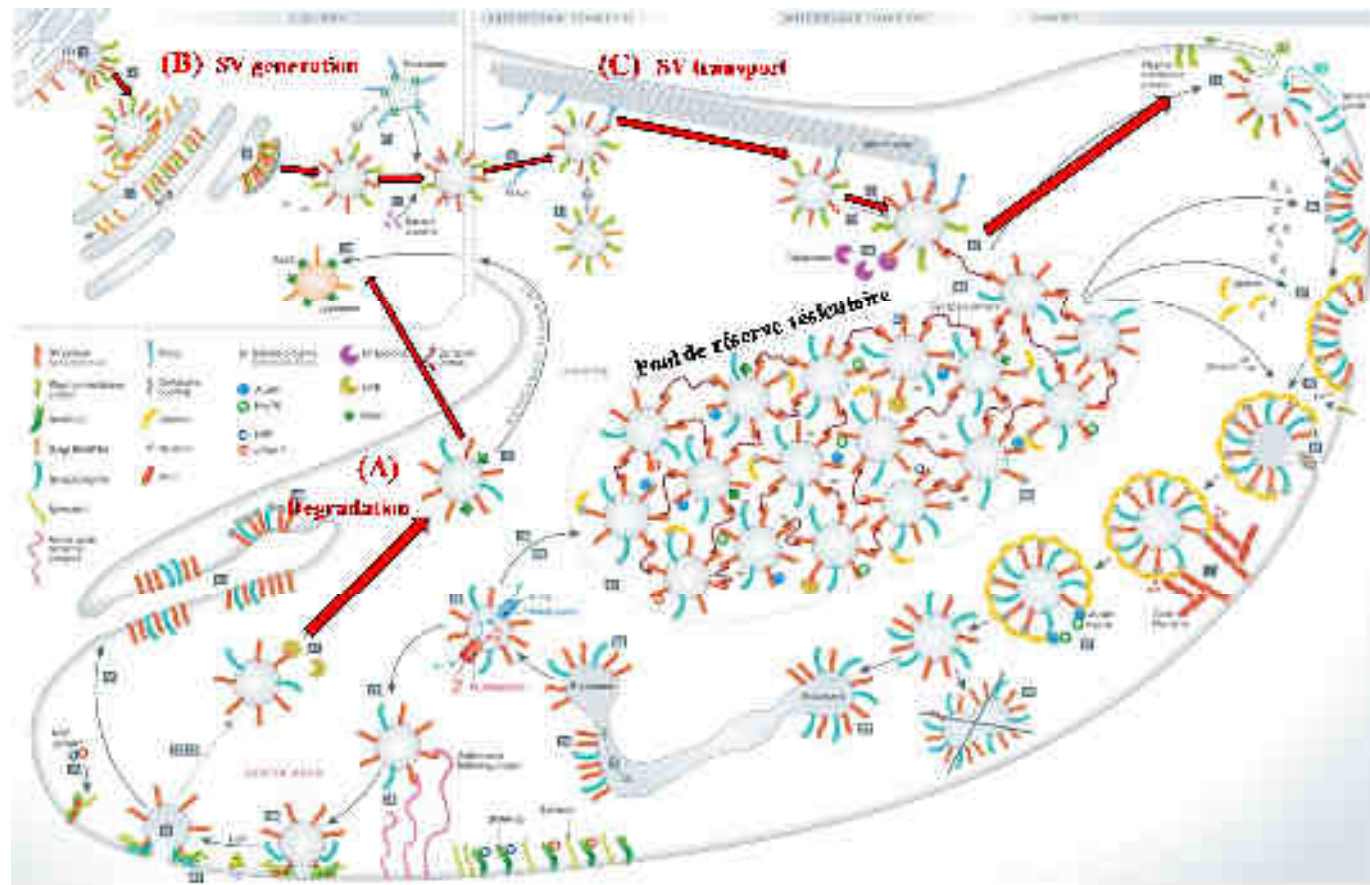


Figure 45. Trois hypothèses de mécanismes de compensation de l'altération du pool de réserve par la L1. (A) Normalisation de la quantité de vésicules à la zone active par la L1. Suite à une libération anormalement élevée des vésicules de réserve, les vésicules libres en excès subissent un transport rétrograde forcé vers la dégradation lysosomale. (B) Normalisation de la quantité de vésicules synaptiques générées au niveau du réticulum endoplasmique. (C) Rétablissement du transport vésiculaire. Une fois acheminées en dehors de l'appareil de Golgi, les vésicules se lient à des protéines moteurs qui les transportent le long des microtubules vers la présynapse. A ce niveau, au lieu d'alimenter le pool de réserve, elles sont directement libérées à la zone active où elles fusionnent à la membrane permettant le relargage des neurotransmetteurs. Adapté de Rizzoli, 2014.

Les substrats indirects de DYRK1A : KIF2A et NR2B

D'autres substrats indirects de DYRK1A ont été mis en lumière dans ce projet. Contrairement à SYN-1, la protéine KIF2A n'est pas phosphorylée de manière directe avec DYRK1A comme l'ont démontré les essais kinases. Néanmoins, les résultats de co-immunoprécipitation suggèrent l'existence d'un complexe DYRK1A-KIF2A et que DYRK1A agirait donc de manière indirecte sur cette cible. KIF2A appartient à la famille des Kinesin-13 qui comprend en outre KIF2B, KIF2C et KIF24. Contrairement aux autres familles des KIFs qui se déplacent le long des microtubules pour assurer le transport des cargos, les Kinesin-13 exercent plutôt un rôle dans la dépolymérisation des microtubules dépendante de l'ATP et régulent ainsi la croissance des axones collatéraux (Desai et al., 1999). En effet, des souris invalidées pour le gène *KIF2A* manifestent une hyper-extension aberrante des branches collatérales causée par l'inhibition de l'activité de dépolymérisation microtubulaire (Homma et al., 2003). De récentes études ont montré que KIF2A était fortement phosphorylée dans le cerveau de souris. Parmi les kinases identifiées on retrouve la p21-Activated kinase 1 (PAK1), la cyclin-dépendent kinase 5 (CDK5) ou encore la Rho-associated protein kinase (ROCK) qui, selon le site de phosphorylation, va supprimer ou activer la croissance neuritique. Ainsi, la dépolymérisation des microtubules est inhibée lorsque PAK1 (résidus Thr186/Thr187, Thr439/Ser440/Ser441, Ser479 et Ser488) et CDK5 (résidus Thr474 et Ser503) phosphorylent KIF2A. A l'inverse, ROCK stimule cette dépolymérisation en phosphorylant le site Thr482. Aucun site consensus de phosphorylation n'a été trouvé pour DYRK1A dans cette analyse, ce qui conforte nos résultats négatifs dans les essais kinase (Ogawa and Hirokawa, 2015). Notre étude phosphoprotéomique a montré que la Ser545 de KIF2A était hyper-phosphorylée par la trisomie puis déphosphorylée suite au traitement par la L41. Il peut donc être supposé que le surdosage de DYRK1A module positivement, de manière directe ou indirecte, une autre kinase responsable de l'hyper-phosphorylation de la Ser545. Parmi les kinases de notre phosphoprotéome qui pourraient être activées par DYRK1A, on retrouve la Mitogen-activated kinase 4 (MAP4K4) ou la CaM Kinase-Like Vesicle Associated (CAMKv) puisque leurs résidus phosphorylés appartiennent au motif de phosphorylation classique de DYRK1A (Suppl. Table 2). Une première expérience de co-immunoprécipitation pourrait indiquer si ces protéines sont complexées à DYRK1A puis des essais kinases pourraient renseigner sur une éventuelle interaction directe ou non. Enfin, la même stratégie expérimentale peut être adoptée en ce qui concerne ces deux kinases et KIF2A. En tous les cas, la régulation anormale de la nouvelle voie de signalisation proposée ici qui inclut DYRK1A et KIF2A pourrait donc expliquer le retard de

croissance axonal, comme déjà observé dans les cultures de neurones corticaux de souris surexprimant DYRK1A (Martinez de Lagran et al., 2012).

Le second substrat indirect de DYRK1A mis en évidence dans ce projet est NR2B. Comme pour KIF2A, DYRK1A n'est pas capable de phosphoryler directement NR2B dans les essais kinases, mais s'associe néanmoins avec cette protéine. Cette dernière NR2B est une sous-unité des récepteurs NMDA glutamatergiques de la post-synapse. De manière générale, les récepteurs NMDARs sont composés de deux sous-unités NR1 pour la liaison de la glycine, et de deux sous-unités NR2 (NR2A, NR2B, NR2C ou NR2D) pour la liaison du glutamate. Les quatre sous-unités NR2 confèrent aux récepteurs NMDARs des spécificités d'expression durant le développement, dans leur localisation post-natale mais également dans leurs propriétés synaptiques. Ainsi, NR2B et NR2D sont fortement exprimées pendant le développement embryonnaire puis leur expression décroît après la naissance. La tendance inverse est observée pour NR2A et NR2C. Chez l'adulte, NR2A est ubiquitaire dans le cerveau, contrairement à NR2B, localisée uniquement au niveau du cerveau antérieur. Au sein de l'hippocampe, NR2A et NR2B sont retrouvés essentiellement dans les cellules pyramidales des régions du CA1 et CA3 ainsi que dans les neurones granulaires du gyrus denté, tandis que NR2C et NR2D sont exprimés de manière plus faible dans les interneurones. Les sous-unités NR2 manifestent également des propriétés synaptiques différentes : les récepteurs NMDARs composés des sous-unités NR2B, NR2C ou NR2D sont capables d'induire un potentiel postsynaptique exciteur plus long que les récepteurs NR1-NR2A (Monyer et al., 1994). Une étude plus récente a montré que, contrairement à NR2A, la sous-unité NR2B est primordiale pour l'induction de la LTP. De plus, ces auteurs ont relevé l'importance de son domaine cytoplasmique probablement dans le recrutement de molécules essentielles à la dépolarisation (Foster et al., 2010). Des modulations de ce domaine C-terminal cytoplasmique par différentes kinases peuvent altérer leurs propriétés physiologiques. En effet, la phosphorylation de NR2B par la Protein kinase C (PKC) en Ser1303 et Ser1323 ou encore par la proto-oncogène tyrosine-protein kinase (SRC) sur les sites Tyr1252, Tyr1336 et Tyr1472 ont pour conséquence une augmentation du courant NMDA (Liao et al., 2001; Salter and Kalia, 2004). Dans notre analyse du phosphoprotéome, la Tyr1304, également située dans la partie C-terminal de NR2B, est significativement hyper-phosphorylée dans l'hippocampe des souris Tg(*Dyrk1a*) et Ts65Dn (**Figure 46**). De même, cette hyper-phosphorylation pourrait entraîner une modification de la réponse synaptique due à l'altération des récepteurs NR1-NR2B. En effet, une diminution de la LTP hippocampique a pu

être observée dans les animaux présentant une trisomie partielle (García-Cerro et al., 2014) mais aussi dans les souris transgéniques au niveau cortical (Thomazeau et al., 2014). Afin d'évaluer l'importance de ce résidu Tyr1304 dans la plasticité synaptique, des études électrophysiologiques dans l'hippocampe et le cortex de ces deux modèles trisomiques comparés aux mêmes modèles mutés sur la Tyr1304 pourraient être envisagées.

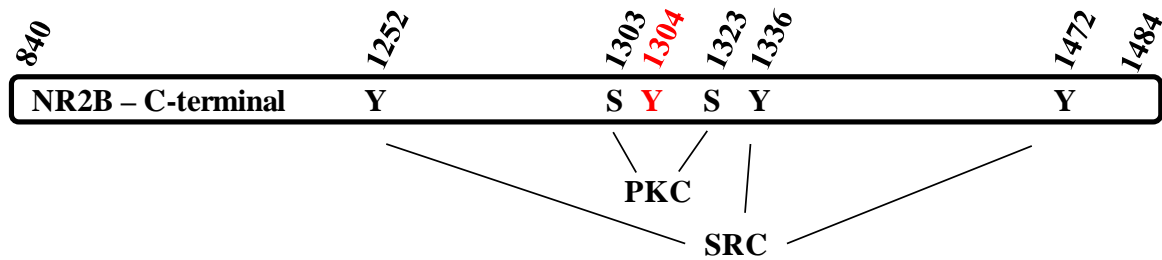


Figure 46. Sites de phosphorylation du domaine C-terminal de la sous-unité NR2B par les kinases PKC et SRC. Le site Y1304 renseigné en rouge correspond au résidu hyperphosphorylé dans l'hippocampe des souris Tg(*Dyrk1a*) et Ts65Dn et qui est ensuite sous-régulé par le traitement à la L41, dans notre analyse du phosphoprotéome.

Le domaine C-terminal de la sous-unité NR2B possède des sites de liaison pour de multiples protéines dont la PSD95 ou encore SYNGAP. Or, ces protéines ont été retrouvées dans les immunoprécipitations de DYRK1A, ce qui indique un complexe entre NR2B et les protéines associées de la PSD et DYRK1A. Il est à noter que la sous-unité GluR1 spécifique aux autres récepteurs glutamatergiques, les récepteurs métabotropiques au glutamate mGlu, n'a pas été retrouvée dans l'immunoprécipitation de DYRK1A. Bien que la kinase ne phosphoryle pas directement NR2B, elle est capable néanmoins de moduler la phosphorylation en Tyr1304 de manière indirecte en influençant une kinase intermédiaire non identifiée. Ceci confère ainsi un autre rôle de DYRK1A dans la régulation de la transmission synaptique glutamatergique exclusivement par les récepteurs NMDARs composés des sous-unités NR1-NR2B.

5. CONCLUSION GENERALE

Ces travaux nous ont apporté une meilleure compréhension du mode d'action de l'inhibiteur de DYRK1A, la Leucettine L41. Mais surtout, ils nous ont permis de valider la kinase DYRK1A comme cible thérapeutique pour corriger certains déficits cognitifs associés à la trisomie 21. Bien que les mécanismes moléculaires restaurés par la drogue restent encore à identifier, nos résultats encouragent néanmoins la poursuite de la recherche d'un candidat-médicament optimisé, dérivé de la L41.

Nous avons à notre disposition des outils pertinents pour caractériser les processus moléculaires sous-jacents aux altérations mnésiques liées au SD. En effet, grâce aux modèles murins de trisomie partielle et transgéniques pour DYRK1A, ainsi que l'outil pharmacologique que constitue la L41, nous avons également pu mettre en lumière une nouvelle cible de la kinase, la SYNAPSINE 1. Cette découverte implique un nouveau rôle de DYRK1A dans la transmission synaptique par la régulation du recyclage des vésicules à la pré-synapse. En outre, la découverte d'autres interacteurs indirects de DYRK1A a ouvert de nouvelles perspectives de recherche pour caractériser plus précisément d'autres rôles de cette kinase dans la trisomie 21. En effet, son interaction avec la protéine KIF2A confère à DYRK1A une fonction dans la croissance axonale par la régulation des microtubules. Enfin, en s'associant avec la sous-unité NR2B et les protéines de la PSD, DYRK1A contrôle également l'activité post-synaptique via les récepteurs au NMDA.

Nous disposons maintenant (1) de la batterie de tests biochimiques, pharmacologiques et comportementaux pour valider et caractériser extensivement tout nouvel inhibiteur de DYRK1A que ManRos Therapeutics propose pour développer un réel candidat-médicament que nous espérons tous pouvoir être amené en étude clinique dans les prochaines années et (2) d'un socle solide pour expliquer un des rôles de DYRK1A dans le développement des déficits cognitifs, et les mécanismes moléculaires sous-jacents.

6. ANNEXES

Symbol	Name	Subcellular location	Biological process	Mouse Protein identification	Int.	Reference
Amph	Amphiphysin	Cytoplasm	Synaptic vesicle endocytosis	Q7TQF7	P	Murakami et al., 2006
App, b-amyloid	Amyloid precursor protein, β -amyloid precursor protein	Cytoplasm	Apoptosis, Cell adhesion, Endocytosis	P12023	P, RE	Kimura et al., 2007 ; Ryoo et al., 2008
Arip4	Androgen Receptor Interacting Protein 4	Nucleus	ATP, DNA and Nucleotide-binding	Q99NG0	Int.	Sitz et al., 2004
Braf	Braf transforming gene	Cytoplasm, Nucleus	ATP, Metal and Nucleotide-binding	P28028	Int.	Kelly and Rahmani, 2005
Casp-9	Cystein aspartyl protease Caspase 9	Cytoplasm, Nucleus	Apoptosis	Q8C3Q9	P	Laguna et al., 2008 ; Seifert et al., 2008
Ccnd1	Cyclin D1, cyclin family	Nucleus, Cytoplasm	Cell cycle and division, Transcription	P25322	P	Chen et al., 2013 ; Najas et al., 2015
Ccnl2	Cyclin L2, cyclin family	Nucleus	Transcription regulation	Q9JJA7	P	De Graaf et al., 2004
CreB	cAMP response element-binding protein	Nucleus	Differentiation, Transcription regulation	Q01147	P	Yang et al., 2001
Cry2	Cryptochrome Circadian Clock 2	Cytoplasm, Nucleus	Biological rhythms, Sensory transduction, Transcription regulation	Q9R194	P	Kurabayashi et al., 2010

Symbol	Name	Subcellular location	Biological process	Mouse Protein identification	Int.	Reference
CTD RnaP II	CTD of the RNA polymerase II	Nucleus	Transcription	P08775	P, DNA binding	Di Vona et al., 2015
Dnm1	Dynamin 1	Cytoplasm	Endocytosis	P39053	P	Chen-Hwang et al., 2002
Endophilin 1	Endophilin 1	Cytoplasm, Membrane	Endocytosis	Q62420	B	Murakami et al., 2009
Fkhr	Forkhead box O1	Cytoplasm, Nucleus	Apoptosis, Autophagy, Differentiation, Transcription regulation	Q9R1E0	P	Woods et al., 2001
Gli1	Glioma-associated oncogene 1	Cytoplasm, Nucleus	Differentiation, Transcription regulation	P47806	P	Mao et al., 2002
Grb2	Growth factor receptor bound protein 2	Cytoplasm, Nucleus	Cell differentiation	Q60631	Int.	Abekhoukh et al., 2013
Gsk3B	Glycogen synthase kinase 3 beta	Nucleus, Cytoplasm, Membrane	Differentiation, Neurogenesis	Q9WV60	P	Skurat and Dietrich, 2004
Grin2a	glutamate receptor, ionotropic, NMDA2A	Cell membrane, Cell junction	Ion transport, Transport	P35436	P	Grau et al., 2014
Hip1	Huntingtin interacting protein 1	Nucleus	Apoptosis, Differentiation, Endocytosis, Transcription regulation	Q8VD75	P	Kang et al., 2005

Symbol	Name	Subcellular location	Biological process	Mouse Protein identification	Int.	Reference
Kip1	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	Cytoplasm	Cell cycle	P46414	P	Soppa et al., 2014
Lin52	Protein lin-52 homolog	Nucleus	Cell cycle, transcription	Q8CD94	P	Litovchick et al., 2011
Map1b	Microtubule-associated protein	Cytoplasm	Axon extension, intracellular transport	P14873	P	Scales et al., 2009
Mek1	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1	Cytoplasm, Nucleus	ATP-binding, Nucleotide-binding	P31938	Int.	Kelly and Rahmani, 2005
Nfatc	Nuclear factor of activated T cells	Cytoplasm, Nucleus	Transcription regulation	O88942 , Q60591 , P97305 , Q8K120	P	Arron et al., 2006 ; Gwack et al., 2006
Notch	Notch Signaling Pathway	Nucleus	Angiogenesis, Differentiation, Transcription	Q01705	P	Fernandez-Martinez et al., 2009
Nrsf / Rest	RE1-silencing transcription factor	Nucleus	Transcription regulation	Q8VIG1	RE	Canzonetta et al., 2008
P53	Transformation related protein 53	Cytoplasm, Nucleus	Transcription Apoptosis, Cell cycle, Necrosis, Transcription	P02340	P	Park et al., 2010
Phyhip	Phytanoyl-CoA Hydroxylase-interacting protein	Cytoplasm	Activation of mitophagy	Q8K0S0	B	Bescond and Rahmani, 2005

Symbol	Name	Subcellular location	Biological process	Mouse Protein identification	Int.	Reference
Park2	Parkin	Cytoplasm, Nucleus	Autophagy, Transcription regulation	Q9WVS6	P	Im and Chung, 2015
Psen1	Presenilin1	Cytoplasm	Apoptosis, Cell adhesion, Notch signaling pathway	P49769	P	Ryu et al., 2010
Ras	GTPase Ras	Cytoplasm	Cell proliferation	Q61411 , P32883 , P08556	Int.	Kelly and Rahmani, 2005
Rcan1/Dscr1	Regulator of calcineurin 1	Cytoplasm, Nucleus	Calcineurin-NFAT signaling cascade	Q9JHG6	P	Song et al., 2013
Srsf1	Serine/arginine-rich splicing factor 1	Cytoplasm, Nucleus	mRNA processing, splicing and transport	Q6PDM2	P	Shi et al., 2008
Srsf2	Serine/arginine-rich splicing factor 2	Nucleus	RNA splicing	Q62093	P	Qian et al., 2011
Sept4	Septine4	Cytoplasm	GTP-binding, Nucleotide-binding	P28661	P	Sitz et al., 2008
Sf3b1/Sap155	Splicing factor 3b, subunit 1	Nucleus	mRNA processing, mRNA splicing	Q99NB9	P	De Graaf et al., 2006
Sirt1	Sirtuin 1	Cytoplasm, Nucleus	Apoptosis, Differentiation, Myogenesis, Transcription	Q923E4	P	Guo et al., 2010

Symbol	Name	Subcellular location	Biological process	Mouse Protein identification	Int.	Reference
Snca	a-synuclein	Cytoplasm, Nucleus	Synaptic function	O55042	P	Kim E.J. et al., 2006
Snr1	Integrase interactor 1	Nucleus	Cell cycle, Neurogenesis, Transcription regulation	Q9Z0H3	P	Kinstrie et al., 2006
Spry2	Sprouty2	Cytoplasm	Developmental protein	Q9QXV8	P	Aranda et al., 2008
Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3	Cytoplasm, Nucleus	Acute phase, Transcription, Transcription regulation	P42227	P	Kurabayashi et al., 2015
Synj1	Synaptojanin 1	Cytoplasm	Endocytosis	Q8CHC4	P	Chen C. et al., 2014
Tau	Microtubule-associated protein Tau	Cytoplasm	Brain development	P10637	P	Ryoo et al., 2007
Wasl	Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein	Cytoplasm, Nucleus	Cell cycle, Cell division, Mitosis, Transcription	Q91YD9	P	Park et al., 2012
Wdr68	DDB1 and CUL4 associated factor 7	Cytoplasm, Nucleus	Ubl conjugation pathway	P61963	B	Morita et al., 2006; Miyata and Nishida, 2011

Suppl. Table 1. Protéines interagissant avec DYRK1A. Tableau tiré de (Duchon and Herault, 2016). *P*, phosphorylation by *Dyrk1A*; *RE*, regulate expression; *Int.*, interaction with *Dyrk1A*; *B*, binding with *Dyrk1A*.

HIPPOCAMPE

Gene name	Protein Group Accessions	Sequence	phosphoRS Site Probabilities	Ts65Dn(wt) + L41/wt	Ts65Dn /wt	Ts65Dn+L41 /Ts65Dn	Tg(Dyrk1a)(wt) + L41 / wt	Tg(Dyrk1a) /wt	Tg(Dyrk1a) + L41/Tg(Dyrk1a)	Mouse pSite	Human pSite
Map1a	Q9QYR6	SPESLS S PAMEDLAM EWGGK	S(1): 0.0; S(4): 0.3; S(6): 5.0; S(7): 94.7	1,13	0,72	-0,03	-0,25	0,33	-0,59	Ser1316	
Map1a	Q9QYR6	VPL S RSPQAQDTLGLAGGQTGCTIQLLPEQDK	S(4): 47.2; S(6): 47.2; T(12): 2.3; S(15): 0.6; T(21): 2.3; T(24): 0.6	0,64	0,24	0,33	0,16	0,91	-0,56	Ser1060 Ser1062	Ser1069
Map1a	Q9QYR6	GFK S PPCEDFSVTGESEK	S(4): 100.0; S(11): 0.0; S(16): 0.0	0,24	-0,15	-0,66	-0,17	-0,59	0,18	Ser908	Ser909
Map1a	Q9QYR6	SHWDDGTND S DLEK	S(1): 0.0; T(7): 0.0; S(10): 100.0	0,47	-0,71	0,78	0,27	0,48	-0,31	Ser2082	
Map1a	Q9QYR6	VPSAPGQES S PVPTK	S(3): 0.4; S(9): 99.6; T(14): 0.0	0,42	-0,71	0,82	0,07	0,32	0,01	Ser1789	Ser1818
Map1a	Q9QYR6	SHWDDGTND S DLEK	S(1): 0.0; T(7): 0.0; S(10): 100.0	0,30	-0,72	0,28	0,30	0,09	-0,05	Ser2082	
Map1a	Q9QYR6	SPFEI S PPASPPPEMTGQR	S(1): 0.0; S(7): 100.0; S(11): 0.0; T(16): 0.0	0,17	-0,74	0,02	-0,38	0,33	-0,30	Ser1768	Ser1797
Map1a	Q9QYR6	GEPVPAWEGK S PEQEV	S(11): 100.0	0,29	-0,79	0,40	-0,12	-0,08	0,02	Ser1648	Ser1675
Map1a	Q9QYR6	AELEEMEEVH S DEEEEEETKAESFYQK	S(12): 33.3; T(19): 33.3; S(23): 33.3; Y(25): 0.2	-0,33	-0,84	0,27	-0,25	-0,72	0,55	Ser667 Ser678 Ser680	Ser667
Map1a	Q9QYR6	APISLSQDP S PPLNGSTTSCGPDR	S(4): 0.0; S(6): 0.0; S(10): 100.0; S(16): 0.0; T(17): 0.0; T(18): 0.0; S(19): 0.0	-0,24	-0,90	0,49	0,08	0,13	-0,30	Ser2048	Ser2074
Map1a	Q9QYR6	SEPQDFQEDSWGD T K	S(1): 0.0; S(10): 5.4; T(14): 94.6	-0,21	-0,98	0,56	0,34	0,47	-0,05	Ser1027	
Map1a	Q9QYR6	TEATQGLDYVPSAGTI S PTSSLEEDKGFK	T(1): 0.0; T(4): 0.0; Y(9): 0.0; S(12): 0.0; T(15): 0.2; S(17): 24.9; T(19): 24.9; S(20): 24.9; S(21): 24.9	-0,73	-0,99	0,89	0,63	0,30	0,45	Ser895 Thr897 Ser898 Ser899	Ser896 Thr898 Ser899 Ser900
Map1b	P14873	SEQSSM S IEFGQESPEHSLAMDFSR	S(1): 0.0; S(4): 0.0; S(5): 0.4; S(7): 49.6; S(14): 49.6; S(18): 0.4; S(24): 0.0	0,99	1,06	-0,17	-0,10	0,20	-0,04	Ser1642 Ser1649	Ser1646 Ser1653
Map1b	P14873	TTR S PDTSAYCYETMEK	T(1): 0.2; T(2): 0.2; S(4): 99.5; T(7): 0.0; S(8): 0.0; Y(10): 0.0; Y(12): 0.0; T(14): 0.0	1,14	0,55	-0,56	0,03	0,05	0,40	Ser2030	
Map1b	P14873	SQG S TNSDWMK	S(1): 0.0; S(4): 93.3; T(5): 5.9; S(6): 0.4; S(8): 0.4	0,10	0,34	0,13	0,04	-0,30	-0,17	Ser339	Ser339
Map1b	P14873	EEQ S SPVKA E VAEK	S(4): 100.0	0,07	-0,04	-0,08	-0,59	-0,65	-0,10	Ser614	Ser614
Map1b	P14873	ASLSPMDEPVPDSE S PVEK	S(2): 0.0; S(4): 0.0; S(13): 0.0; S(15): 100.0	-0,01	-0,18	0,40	-0,03	0,82	-0,09	Ser1384	Ser1389

Map1b	P14873	DLTTSSVEK	T(3): 0.0; T(4): 5.6; S(5): 88.8; S(6): 5.6	0,25	-0,37	0,04	1,38	3,35	-2,96	Ser1850
Map1b	P14873	DYNASASTISPPSSMEEDK	Y(2): 0.0; S(5): 0.0; S(7): 0.0; T(8): 0.0; S(10): 99.6; S(13): 0.2; S(14): 0.2	0,70	-0,54	0,33	-0,82	-0,61	-0,25	Ser1204 Ser1208
Map1b	P14873	TPEEGGYSEISEK	T(1): 100.0; Y(7): 0.0; S(8): 0.0; Y(9): 0.0; S(12): 0.0	0,23	-0,74	0,61	-0,19	-0,03	0,11	Thr1945 Thr1949
Map1b	P14873	ASLSPMDEPVPDSESPVEK	S(2): 0.0; S(4): 0.0; S(13): 0.0; S(15): 100.0	0,51	-1,00	0,29	-0,28	-0,19	0,17	Ser1384 Ser1389
Map2	P20357	VGSLDNAHHVPGGGNVK	S(3): 100.0	0,12	-0,46	0,33	-0,33	-0,44	0,08	Ser603 Ser605
Map2	P20357	STELGSDYYELSDSR	S(1): 0.0; T(2): 0.0; S(6): 0.0; Y(8): 0.0; Y(9): 0.0; S(12): 0.0; S(14): 100.0	0,68	-0,64	0,72	-0,03	-0,47	0,25	Ser596
Map2	P20357	GSAQESLDTISPKNQHDEK	S(2): 0.0; S(6): 0.3; T(9): 49.8; S(11): 49.8	0,05	-0,78	-0,09	-0,60	-0,26	0,24	Ser606 Ser608 Thr608 Thr610
Map2	P20357	LASVSADAЕVAR	S(3): 100.0; S(5): 0.0	0,73	-1,56	0,77	0,98	0,98	-0,50	Ser823 Ser821
Pclo	Q9QYX7	TIELNSTVTDK	S(6): 100.0	0,09	0,40	0,37	0,36	0,27	0,06	Ser609
Pclo	Q9QYX7	RSQEVDFLAPLQTSSR	S(2): 100.0; S(15): 0.0; S(16): 0.0	0,11	-0,12	0,53	0,11	-1,02	0,58	Ser4016 Ser4019
Pclo	Q9QYX7	GSVPAАAAE SPSMHR	S(2): 0.0; S(10): 94.2; S(12): 5.8	0,37	-0,35	0,28	0,64	0,79	-0,74	Ser75 Ser78
Pclo	Q9QYX7	ENPELVDDLSPR	S(10): 100.0	0,35	-0,73	0,37	-0,23	-0,17	-0,07	Ser1439
Pclo	Q9QYX7	TSIGSSSSEEYKQEDSQSGEDED FIR	T(1): 0.0; S(2): 0.0; S(5): 0.0; S(6): 0.0; S(7): 0.0; S(8): 0.0; Y(11): 0.0; S(16): 0.7; S(19): 99.3	-0,47	-0,80	0,44	-0,59	-0,14	0,18	Ser1484 Ser1480
SYN-1	O88935	QSRPVAGGPGAPPAARPPASPSQR	S(2): 0.0; S(20): 0.3; S(22): 99.7	0,12	0,25	0,42	1,14	0,70	0,30	Ser553 Ser553
SYN-1	O88935	QASISGPAPTK	S(3): 100.0; S(5): 0.0; T(10): 0.0	0,26	-1,05	0,85	0,17	0,21	-0,02	Ser568 Ser568

CORTEX

Gene name	Protein Group Accessions	Sequence	phosphoRS Site Probabilities	Ts65Dn(wt) + L41/wt	Ts65Dn /wt	Ts65Dn+L41 /Ts65Dn	Tg(Dyrk1a)(wt) + L41 / wt	Tg(Dyrk1a) /wt	Tg(Dyrk1a) + L41/Tg(Dyrk1a)	Mouse pSite	Human pSite
Map1a	Q9QYR6-2	QLSPESLGTLQFGELSLGK	S(3): 88.6; S(6): 5.7; T(9): 5.7; S(16): 0.0	0,16	-0,48	0,57	0,27	0,57	-0,05	Ser1205	Ser1218
Map1a	Q9QYR6-2	ELSSAVSPPNLHSDTPTFSYASLAGPTIPPR	S(3): 0.0; S(4): 0.8; S(7): 99.2; S(13): 0.0; T(15): 0.0; T(17): 0.0; S(19): 0.0; Y(20): 0.0; S(22): 0.0; T(27): 0.0	0,39	0,61	-0,29	0,18	0,18	0,12	Ser1993	Ser2022
Map1a	Q9QYR6-2	ELALSPEDLTQDFEELK	S(5): 4.0; S(6): 96.0; T(11): 0.0	-0,12	-0,55	0,40	0,17	0,77	-0,46	Ser527	Ser527

Map1a	Q9QYR6-2	MASPPPSGPPSAAHTPFHQSPVEEK	S(3): 95.4; S(7): 2.3; S(11): 2.3; T(15): 0.0; S(20): 0.0	-0,28	-0,46	-0,01	0,15	-0,36	0,22	Ser991	Ser996
Map1a	Q9QYR6-2	VAELEEESQGSSSYSDWVK	S(9): 100.0; S(12): 0.0; S(13): 0.0; S(14): 0.0; Y(15): 0.0; S(16): 0.0	1,25	0,81	-0,36	0,11	0,98	-0,61	Ser114	Ser114
Map1a	Q9QYR6-2	APISLSQDPSPLNGSTTSCGPDR	S(4): 0.0; S(6): 0.0; S(10): 100.0; S(16): 0.0; T(17): 0.0; T(18): 0.0; S(19): 0.0	-0,77	0,00	0,02	-0,01	-0,42	0,16	Ser2048	Ser2074
Map1a	Q9QYR6-2	MASPPPSGPPSAAHTPFHQSPVEEK	S(3): 100.0; S(7): 0.0; S(11): 0.0; T(15): 0.0; S(20): 0.0	-0,36	-0,44	0,10	-0,07	-0,41	0,46	Ser991	Ser996
Map1a	Q9QYR6-2	EMTLDQKSPEK	T(3): 1.2; S(8): 98.8	0,02	-0,09	0,23	-0,15	-0,39	0,17	Ser1580	Ser1600
Map1a	Q9QYR6-2	MASPPPSGPPSAAHTPFHQSPVEEK	S(3): 98.9; S(7): 1.1; S(11): 0.0; T(15): 0.0; S(20): 0.0	-0,44	-0,88	0,77	-0,26	-0,30	-0,31	Ser991	Ser996
Map1a	Q9QYR6-2	EMTLDQKSPEK	T(3): 0.1; S(8): 99.9	0,24	-0,10	0,29	-0,36	-0,42	0,14	Ser1580	Ser1600
Map1b	P14873	SPPLLGSESPYEDFLSADSK	S(1): 100.0; S(7): 0.0; S(9): 0.0; Y(11): 0.0; S(16): 0.0; S(19): 0.0	-0,63	-0,58	0,26	0,43	0,45	-0,28	Ser1395	Ser1400
Map1b	P14873	TTRSPDTSAYCYETMEK	T(1): 0.0; T(2): 6.8; S(4): 93.1; T(7): 0.0; S(8): 0.0; Y(10): 0.0; Y(12): 0.0; T(14): 0.0	0,54	0,61	-0,65	0,21	0,35	0,20	Ser2030	
Map1b	P14873	TPEEGGYSEISEK	T(1): 100.0; Y(7): 0.0; S(8): 0.0; Y(9): 0.0; S(12): 0.0	0,75	1,27	-1,03	0,01	0,56	-0,01	Thr1945	Thr1949
Map1b	P14873	DYNASASTISPPSSMEEDK	Y(2): 0.0; S(5): 0.0; S(7): 0.2; T(8): 1.2; S(10): 87.6; S(13): 9.9; S(14): 1.2	0,36	0,51	0,03	0,00	0,25	-0,40	Ser1204	Ser1208
Map1b	P14873	LGGDVSPTQIDVSQLGFSFK	S(6): 50.0; T(8): 50.0; S(13): 0.0; S(17): 0.0	-0,14	0,31	0,12	-0,33	-0,45	0,04	Ser1497 Thr1499	Ser1501 Thr1503
Map1b	P14873	TLEVSPSQSVTGSAGHTPPYQSPTDEK	T(1): 0.0; S(6): 94.1; S(8): 0.8; S(10): 0.8; T(12): 0.8; S(14): 0.8; T(18): 0.8; Y(20): 0.8; Y(21): 0.8; S(23): 0.0; T(25): 0.0	0,03	-0,02	-0,23	-0,46	-0,39	0,08	Ser1317	Ser1322
Map1b	P14873	VLSPLRSPPLLGSESPYEDFLSADSK	S(3): 0.8; S(7): 96.9; S(13): 0.8; S(15): 0.8; Y(17): 0.8; S(22): 0.0; S(25): 0.0	0,33	0,44	0,29	-0,64	-0,81	0,34	Ser1395	Ser1400
Map1b	P14873	DYNASASTISPPSSMEEDKFSK	Y(2): 0.0; S(5): 0.0; S(7): 0.6; T(8): 0.6; S(10): 98.8; S(13): 0.0; S(14): 0.0; S(21): 0.0	-0,06	0,05	-0,38	-0,74	-0,43	-0,24	Ser1204	Ser1208
Map2	P20357	ETSPETSLIQDEVALK	T(2): 47.5; S(3): 47.5; T(6): 2.5; S(7): 2.5	0,17	0,09	-0,15	-0,14	0,87	-1,31	Thr1160 Ser1161	Thr1154 Ser1155
Map2	P20357	YTVPLSPVQDSENLSGEGSGFYEGTDDK	Y(1): 0.0; T(2): 0.0; S(7): 99.7; S(12): 0.2; S(16): 0.0; S(19): 0.0; S(21): 0.0; Y(23): 0.0; T(26): 0.0	-0,35	-0,54	0,75	-0,29	-0,62	0,10	Ser883	Ser881

Pclo	Q9QYX7	GGSLGCQTETDPD TQSP YMGAT SP PKDK	S(3): 0.0; T(8): 0.0; T(10): 0.0; T(14): 20.0; S(16): 20.0; Y(19): 20.0; T(23): 20.0; S(24): 20.0	-0,58	-0,97	0,52	-0,09	-0,10	0,16	Thr3504 Ser3506 Y3509 Thr3513 Ser3514	Ser3508 Ser3511 Ser3515 Ser3516
Pclo	Q9QYX7	KIVDSGVQ T DDEETADR	S(5): 0.1; T(9): 99.9; T(14): 0.0	-0,50	0,55	0,03	0,19	0,22	-0,04	Thr3373	
Pclo	Q9QYX7	SEGITKPSLQ Q SPK	S(1): 0.0; T(5): 0.0; S(8): 0.0; S(13): 100.0	-0,47	-0,30	0,27	0,36	0,74	-0,80	Ser212	
SYN-1	O88935	QSRPVAGGPGAPPA ARPPA SPSPQR	S(2): 0.0; S(20): 50.0; S(22): 50.0	-0,19	-0,34	-0,11	0,18	0,47	-0,29	Ser551 Ser553	Ser551 Ser553
SYN-1	O88935	QSRPVAGGPGAPPA ARPPA SPSPQR	S(2): 0.0; S(20): 1.3; S(22): 98.7	-0,22	-0,27	-0,14	0,26	0,46	-0,16	Ser553	Ser553
SYN-1	O88935	LP S PTAAPQQSASQATPVTQ Q QGR	S(3): 99.4; T(5): 0.6; S(11): 0.0; S(13): 0.0; T(16): 0.0; T(19): 0.0	-0,22	0,50	-0,13	0,27	0,35	-0,84	Ser510	Ser510

CERVELET

Gene name	Protein Group Accessions	Sequence	phosphoRS Site Probabilities	Ts65Dn(wt) + L41/wt	Ts65Dn /wt	Ts65Dn+L41 /Ts65Dn	Tg(Dyrk1a)(wt) + L41 / wt	Tg(Dyrk1a) /wt	Tg(Dyrk1a) + L41/Tg(Dyrk1a)	Mouse pSite	Human pSite
Map1a	Q9QYR6	ELSSEPR T PPAQK	S(3): 0.0; S(4): 0.0; T(8): 100.0	0,16	0,07	0,42	0,47	0,50	0,03	Thr504	Thr504
Map1a	Q9QYR6	MASPPPSGPP S AAHTPFHQSPVEEK	S(3): 11.2; S(7): 11.2; S(11): 77.5; T(15): 0.0; S(20): 0.0	-0,44	-0,48	0,22	0,22	0,79	-0,28	Ser999	Ser1004
Map1a	Q9QYR6	ELSSAV S PPNLHSDTPTFSYASLAGPTIPPR	S(3): 0.0; S(4): 0.0; S(7): 98.9; S(13): 0.5; T(15): 0.5; T(17): 0.0; S(19): 0.0; Y(20): 0.0; S(22): 0.0; T(27): 0.0	0,44	0,09	-0,22	0,17	0,50	-0,47	Ser1993	Ser2022
Map1a	Q9QYR6	QL S PESLGLQFGELSLGK	S(3): 100.0; S(6): 0.0; T(9): 0.0; S(16): 0.0	0,34	0,29	-0,20	0,16	0,40	-0,20	Ser1205	Ser1218
Map1a	Q9QYR6	EMTL D QK S PEK	T(3): 0.0; S(8): 100.0	0,40	-0,05	0,36	-0,16	-0,61	0,33	Ser1580	Ser1600
Map1a	Q9QYR6	WLA S PVGLPPEEEDK	S(5): 100.0	0,20	0,17	0,00	-0,19	-0,47	0,11	Ser1747	Ser1776
Map1a	Q9QYR6	VAELEE S QGSSTSYSDWVK	S(9): 100.0; S(12): 0.0; S(13): 0.0; S(14): 0.0; Y(15): 0.0; S(16): 0.0	-0,13	-0,13	0,17	-0,46	0,41	-0,66	Ser114	Ser114
Map1b	P14873	TTEAAATAV G TAAATTAAVVAAAGIAASGPVK	T(1): 0.0; T(2): 0.2; T(7): 16.3; T(11): 83.3; T(14): 0.2; T(15): 0.0; S(27): 0.0	0,03	-0,09	-0,23	0,76	0,83	-0,66	Thr798	
Map1b	P14873	DYNASAST S PPSSMEEDK	Y(2): 0.0; S(5): 0.0; S(7): 0.0; T(8): 0.2; S(10): 99.7; S(13): 0.0; S(14): 0.0	0,99	1,39	-1,48	0,24	0,41	0,31	Ser1204	Ser1208

Map1b	P14873	ASLSPMDEPVPDSESPVEK	S(2): 50.0; S(4): 50.0; S(13): 0.0; S(15): 0.0	0,24	0,31	-0,27	0,23	-0,46	0,66	Ser1371 Ser1373	Ser1376 Ser1378
Map1b	P14873	SQGSTNSDWMK	S(1): 0.0; S(4): 0.0; T(5): 0.1; S(6): 50.0; S(8): 50.0	-0,07	-0,53	0,52	-0,03	0,05	-0,04	Ser341 Ser343	Ser343
Map1b	P14873	TTRSPDTSAYCYETMEK	T(1): 0.0; T(2): 0.2; S(4): 99.8; T(7): 0.0; S(8): 0.0; Y(10): 0.0; Y(12): 0.0; T(14): 0.0	1,31	1,70	-1,15	-0,18	-0,23	0,12	Ser2030	
Map2	P20357	ETSPETSLIQDEVALK	T(2): 99.7; S(3): 0.2; T(6): 0.0; S(7): 0.0	0,02	-0,04	0,21	0,08	0,76	-0,66	Ser1160	Ser1151
Map2	P20357	LASVSADAEVAR	S(3): 94.4; S(5): 5.6	-0,37	-0,33	-0,02	0,06	0,41	-0,22	Ser823	Ser821
Map2	P20357	ASQSPPAQAEAGYSTLAQSYTPDHPSELPEEPSQPQR	S(2): 0.0; S(5): 0.0; Y(13): 0.0; S(14): 0.0; T(15): 0.0; S(19): 0.0; Y(20): 0.0; T(21): 0.0; S(26): 0.0; S(33): 12.1; S(34): 87.9	-1,16	0,58	0,09	-0,03	0,18	-0,34	Ser655	Ser654
Map2	P20357	DGSPDAPATPEKEEVAFSEYK	S(3): 100.0; T(9): 0.0; S(18): 0.0; Y(20): 0.0	-0,26	-0,39	0,54	-0,15	-0,21	0,31	Ser1352	Ser1347
Pclo	Q9QYX7	GGSLGCQTETDPDTQSPPYMGATSPPKDK	S(3): 0.0; T(8): 0.0; T(10): 0.0; T(14): 20.0; S(16): 20.0; Y(19): 20.0; T(23): 20.0; S(24): 20.0	-0,14	-0,15	-0,03	-0,32	-0,81	0,30	Thr3504 Ser3506 Y3509 Thr3513 Ser3514	Ser3508 Ser3511 Ser3515 Ser3516
Pclo	Q9QYX7	KDSFSQESSPSSPSDLAK	S(3): 0.0; S(5): 0.0; S(8): 0.0; S(9): 0.0; S(11): 94.8; S(12): 5.2; S(14): 0.0	0,24	-0,04	0,22	0,18	0,38	-0,25	Ser1340	Ser1335
Pclo	Q9QYX7	KDSFSQESSPSSPSDLAK	S(3): 0.0; S(5): 0.0; S(8): 0.0; S(9): 0.0; S(11): 48.1; S(12): 48.1; S(14): 3.8	-0,01	-0,27	0,31	0,14	0,65	-0,42	Ser1340 Ser1341	Ser1335 Ser1336
Pclo	Q9QYX7	LPTAVSLYSPTEQSVMQK	T(3): 0.0; S(6): 0.0; Y(8): 0.4; S(9): 49.8; T(11): 49.8; S(15): 0.0	-0,11	0,34	-0,27	0,22	-0,50	0,28	Ser1829 Thr1831	Ser1835 Thr1827
Pclo	Q9QYX7	SVDTSVQTDDQDEWDMPSR	S(1): 0.0; T(4): 0.6; S(5): 0.6; T(8): 98.8; S(20): 0.0	0,06	0,55	-0,50	0,27	-0,04	-0,05	Thr3403	Thr3405
SYN-1	O88935	QSRPVAGGPGAPPAARPPASPPQR	S(2): 0.0; S(20): 1.2; S(22): 98.8	0,00	0,33	-0,08	0,51	0,49	-0,31	Ser553	Ser553
SYN-1	O88935	QTSQQPAGPPAQRRPPPGGPPQPGPGPQR	T(2): 15.6; S(3): 84.4	-0,43	0,62	-1,67	0,47	0,80	-0,73	Ser449	Ser449
SYN-1	O88935	SQSLTNAFNLPEPAPRRPSLSQDEVK	S(1): 0.0; S(3): 0.0; T(5): 0.0; S(19): 50.0; S(21): 50.0	0,13	0,51	-0,14	0,59	0,48	-0,27	Ser682 Ser684	Ser681 Ser683

Suppl. Table 2. Liste des peptides des 5 protéines communes aux Tg(*Dyrk1a*) et Ts65Dn exprimées dans l'analyse phosphoprotéomique des trois régions (hippocampe, cortex,cervelet). La phosphorylation de ces peptides est sur- ou sous-réglée par la trisomie et sensible à la L41. Les résidus apparaissant en bleu correspondent aux sites phosphorylés. Seule la SYN-1 possède un site consensus de phosphorylation spécifique à DYRK1A, indiqué en caractères rouges. Les valeurs sont exprimées en $\log_2(\text{Ratio})$. Les cases de couleur rose indiquent une hyper-phosphorylation significative par rapport au contrôle. Les cases de couleur bleues indiquent une sous-phosphorylation significative par rapport au contrôle. Les cases de couleur grise sont des variations de phosphorylation non-significatives par rapport au contrôle.

HIPPOCAMPE

Gene name	Protein Group Accessions	Sequence	phosphoRS Site Probabilities	Tg(Dyrk1a) / wt	Tg(Dyrk1a)+L41 / Tg(Dyrk1a)
Camkv	Q3UHL1	SATPATD GRATP ATEESTVPATQSSALPAAK	S(1): 2.4; T(3): 2.4; T(6): 2.4; T(11): 44.8; T(14): 44.8; S(17): 2.4; T(18): 0.6; T(22): 0.0; S(24): 0.0; S(25): 0.0	0,85	-0,26
Fam103a1	Q9CQY2	RPPE SPPIVEEWSNR	S(5): 100.0; S(14): 0.0	-0,28	0,45
Map4k4	F8VPL5	RDS PLQGGGQQNSQAGQR	S(3): 100.0; S(13): 0.0	0,48	-0,20
Sept4	P28661-2	VARPQILEP RPQ SPDLCDDDVEFR	S(13): 100.0	-0,47	0,17
Slc4a10	Q5DTL9-2	DSGLED GRES PSFDTPSQR	S(2): 0.0; S(10): 99.5; S(12): 0.5; T(15): 0.0; S(17): 0.0	-0,47	-0,39
Slc9a6	A1L3P4	LVLPMDDSEPALNSLDDT RH SPA	S(8): 0.0; S(14): 0.0; T(18): 6.0; S(21): 94.0	-0,55	-0,02
Slc9a6	A1L3P4	LVLPMDDSEPALNSLDDT RH SPA	S(8): 0.0; S(14): 0.0; T(18): 0.7; S(21): 99.3	-0,59	0,25
Sptbn1	Q62261	RP PSDPNTK	S(4): 100.0; T(9): 0.0	0,29	0,50
Stxbp5	D3Z2Q2	RPV SVSPSSSQEISENQYAVICSEK	S(4): 0.1; S(6): 0.5; S(8): 4.9; S(9): 47.0; S(10): 47.0; S(14): 0.5; S(23): 0.0	0,25	0,58
SYN-1	O88935	QSRPVAGGPGAPPA RP PASPSQR	S(2): 0.0; S(20): 0.3; S(22): 99.7	0,70	0,30
				Ts65Dn / wt	Ts65Dn+L41 / Ts65Dn
Cask	O70589	TQSSCER RD SPSTR	T(1): 0.8; S(3): 0.8; S(4): 0.0; S(5): 0.0; S(10): 97.7; S(12): 0.0; T(13): 0.8; S(14): 0.0	0,86	-0,71
Cys1	Q8R4T1	DP RP ATPSGGR	T(6): 91.3; S(8): 8.7	1,87	-2,15
Enah	Q03173-4	NS RP SSPVNTPSSQPPAAK	S(2): 0.0; S(5): 5.0; S(6): 95.0; T(10): 0.0; S(12): 0.0; S(13): 0.0	1,11	-0,42
Enah	Q03173-4	NS RP SSPVNTPSSQPPAAK	S(2): 3.1; S(5): 48.5; S(6): 48.5; T(10): 0.0; S(12): 0.0; S(13): 0.0	0,36	-0,44
Palmd	Q9JHU2	RSNGPTHSTP TR TPQPR	S(1): 0.0; T(5): 0.3; T(7): 49.7; S(8): 49.7; T(10): 0.3; T(13): 0.0	1,15	-1,30
Palmd	Q9JHU2	SNPHTHTSP TR TPQPR	S(2): 0.0; T(6): 0.0; T(8): 50.0; S(9): 50.0; T(11): 0.0; T(14): 0.0	-0,85	-0,07
Slc9a6	A1L3P4	LVLPMDDSEPALNSLDDT RH SPA	S(8): 0.0; S(14): 0.0; T(18): 0.7; S(21): 99.3	0,35	0,37
Sptbn1	Q62261	RP PSDPNTK	S(2): 93.7; S(3): 6.3; S(7): 0.0; T(9): 0.0	0,38	-0,22
Vps35	Q9EQH3	RES PESEGIYEGILIL	S(3): 93.6; S(6): 6.4; Y(11): 0.0	0,62	-0,45

CORTEX

Gene name	Protein Group Accessions	Sequence	phosphoRS Site Probabilities	Tg(Dyrk1a) / wt	Tg(Dyrk1a)+L41 / Tg(Dyrk1a)
Camsap2	Q8C1B1	RF SPSQVPIQTR	S(3): 100.0; S(5): 0.0; T(11): 0.0	0,50	-0,32
Slc9a6	A1L3P4	LVLPMDDSEPALNSLDDT RH SPA	S(8): 0.0; S(14): 0.0; T(18): 11.0; S(21): 89.0	0,54	-0,49
Srcin1	B1AQX6	GEPDPE RSS PMLSADDAEYPR	S(8): 88.5; S(9): 11.4; S(14): 0.0; Y(20): 0.0	0,51	-0,08
SYN-1	O88935	QSRPVAGGPGAPPA RP PASPSQR	S(2): 0.0; S(20): 50.0; S(22): 50.0	0,47	-0,29

SYN-1	O88935	QSRPVAGGPGAPPAAR PPAS SPQR	S(2): 0.0; S(20): 1.3; S(22): 98.7	0,46	-0,16
Avi9	Q80U56	YLELPP RPS ESSESDWETLDPSVLEDASLK	S(2): 0.0; S(5): 0.7; S(7): 99.3; T(11): 0.0	Ts65Dn / wt	Ts65Dn+L41 / Ts65Dn
Camkv	Q3UHL1	SATPATD GRATP ATEESTVPATQSSALPAAK	S(1): 0.0; T(3): 0.0; T(6): 0.6; T(11): 99.2; T(14): 0.1; S(17): 0.0; T(18): 0.0; T(22): 0.0; S(24): 0.0; S(25): 0.0	0,97	-0,44
Camkv	Q3UHL1	SATPATD GRATP ATEESTVPATQSSALPAAK	S(1): 0.0; T(3): 0.0; T(6): 1.1; T(11): 98.9; T(14): 0.0; S(17): 0.0; T(18): 0.0; T(22): 0.0; S(24): 0.0; S(25): 0.0	-0,54	-0,65
Coro1a	O89053	RATP EPSGTPSSDTSVSR	T(3): 100.0; S(7): 0.0; T(9): 0.0; S(11): 0.0; S(12): 0.0; T(14): 0.0; S(16): 0.0	-1,10	0,17
Ctnn	Q60598	QTPPAS PSPQPIEDRPPSSP IYEDAAPFK	T(2): 0.0; S(6): 0.2; S(8): 99.8; S(18): 0.0; S(19): 0.0; Y(22): 0.0	-0,73	-0,28
Hcn1	O88704	RLGTP PGGGAAGK	T(4): 100.0	-0,13	0,52
Map1b	P14873	QGF PDRES PVSDLTSTGLYQDK	T(1): 0.0; T(2): 6.8; S(4): 93.1; T(7): 0.0; S(8): 0.0; Y(10): 0.0; Y(12): 0.0; T(14): 0.0	-0,52	0,34
Palmd	Q9JHU2	SNGP HTSPTRPTP QPR	S(1): 0.0; T(5): 0.6; T(7): 0.6; S(8): 98.7; T(10): 0.0; T(13): 0.0	0,61	-0,65
Ppp1r1a	Q9ERT9	RPTP ATLVLTSDQSSPEIDEDR	T(3): 0.0; T(6): 0.0; T(10): 0.0; S(11): 0.0; S(14): 0.3; S(15): 99.7	1,00	-1,26
Prpsap2	Q8R574	LGI AVIHGEA QDAESDLVDG RHS PPMVR	S(15): 0.0; S(23): 100.0	-0,65	0,59
				-0,86	0,19

CERVELET

Gene name	Protein Group	Accessions	Sequence	phosphoRS Site Probabilities	Tg(Dyrk1a) / wt	Tg(Dyrk1a)+L41 / Tg(Dyrk1a)
Kif2a	P28740-1	EFGISPSDIPFSQGGGS RPDLSP SYDYDDFSPSITR	S(5): 0.3; S(7): 0.3; S(12): 32.9; S(17): 32.9; S(22): 32.9; S(24): 0.3; Y(25): 0.3; Y(27): 0.0; S(31): 0.0; S(33): 0.0; T(35): 0.0	0,47	-0,09	
Map4k4	E9PVG7	RDSPL QGGGQQNSQAGQR	S(3): 100.0; S(13): 0.0	0,40	-0,26	
Nlgn2	Q69ZK9	RLSP PGGSGSGVPGGGPLLPTAGR	S(3): 100.0; S(8): 0.0; S(10): 0.0; T(21): 0.0	0,27	-0,62	
Spire1	D3Z495	LRPVSP EIR	S(5): 100.0	0,25	-0,50	
Srcin1	B1AQX6	GEPD PERSSP PMLSADDAEYPR	S(8): 50.0; S(9): 50.0; S(14): 0.0; Y(20): 0.0	-0,18	-0,65	
SYN-1	O88935	QSRPVAGGPGAPPAAR PPAS SPQR	S(2): 0.0; S(20): 1.2; S(22): 98.8	0,49	-0,31	
SYN-1	O88935	QSRPVAGGPGAPPAAR PPAS SPQR	S(2): 0.0; S(20): 1.1; S(22): 98.9	0,17	0,37	
Atn1	O35126	TEQEL RPQSP SDLDSLDR	T(1): 0.0; S(10): 99.4; S(12): 0.6; S(16): 0.0	Ts65Dn / wt	Ts65Dn+L41 / Ts65Dn	
Coro1a	O89053	RATP EPSGTPSSDTSVSR	T(3): 99.8; S(7): 0.1; T(9): 0.0; S(11): 0.0; S(12): 0.0; T(14): 0.0; S(16): 0.0	-0,54	0,16	
Ctnn	Q60598	QTPPAS PSPQPIEDRPPSSP IYEDAAPFK	T(2): 0.0; S(6): 0.2; S(8): 99.4; S(18): 0.2; S(19): 0.2; Y(22): 0.0	1,14	-1,00	
Dnm1	P39053-4	SGQAS PSR ESP RPP FDL	S(1): 0.0; S(5): 0.0; S(7): 0.0; S(11): 100.0	-0,11	-0,42	
Gramd1b	Q80TI0	RSRPT Q NQD GMVEK	S(1): 0.0; S(3): 99.5; T(5): 0.5; T(13): 0.0	0,32	-0,43	
				-0,57	0,05	

Kif2a	P28740-1	EFGISPSDIPFSQGGGS RPDLSP SYDYDDFSPSITR	S(5): 0.3; S(7): 0.3; S(12): 32.9; S(17): 32.9; S(22): 32.9; S(24): 0.3; Y(25): 0.3; Y(27): 0.0; S(31): 0.0; S(33): 0.0; T(35): 0.0	0,81	-0,62
Map1b	P14873	QGFPD RESP VSDLTSTGLYQDK	S(8): 100.0; S(11): 0.0; T(14): 0.0; S(15): 0.0; T(16): 0.0; Y(19): 0.0	0,06	0,50
Map1b	P14873	QGFPD RESP VSDLTSTGLYQDKQEEK	S(8): 87.7; S(11): 12.0; T(14): 0.3; S(15): 0.0; T(16): 0.0; Y(19): 0.0	0,04	0,49
Nlgn2	Q69ZK9	RLSP PGSGSGVPGGGPLLPTAGR	S(3): 100.0; S(8): 0.0; S(10): 0.0; T(21): 0.0	-0,36	0,24
Palmd	Q3UVT7	SNGPHTSPT RPTP QPR	S(1): 0.0; T(5): 0.3; T(7): 49.9; S(8): 49.9; T(10): 0.0; T(13): 0.0	0,96	-0,79
Pcp2	P12660	RNSSP QPQTQAP	S(3): 94.4; S(4): 5.6; T(9): 0.0	0,66	-0,40
Sde2	Q8K1J5	EDGIDAVEVAAD RPGSPR	S(16): 100.0	-0,36	0,25
Shank3	Q4ACU6	LGAEER PGTP ELAPAPMQAAVAEPMPSR	T(10): 100.0; S(29): 0.0	0,90	-0,81
Srrm1	E9QKA4	RESP SPAPKPR	S(3): 100.0; S(5): 0.0	0,41	0,16
Srrm2	Q8BTI8	MVQASSQSLPPAQD RPRSP VPSAFSDQSR	S(5): 0.0; S(6): 0.0; S(8): 0.0; S(19): 100.0; S(23): 0.0; S(26): 0.0; S(29): 0.0	0,06	-0,40
SYN-1	O88935	QSRPVAGGPGAPPA RPPASP SPQR	S(2): 0.0; S(20): 1.1; S(22): 98.9	0,30	-0,42
Vps35	Q9EQH3	RESP ESEGLI	S(3): 100.0; S(6): 0.0; Y(11): 0.0	-0,81	0,00

Suppl. Table 3. Liste des peptides issus de l'analyse du phosphoprotéome retrouvés hyper- ou sous-phosphorylés par la trisomie puis inversement modulés par le traitement à la L41. Les résidus en caractères rouges représentent une séquence consensus de phosphorylation de DYRK1A. Les valeurs sont exprimées en log₂(Ratio). Les cases de couleur rose indiquent une sur-phosphorylation significative par rapport au contrôle. Les cases de couleur bleues indiquent une sous-phosphorylation significative par rapport au contrôle. Et les cases de couleur grise sont des variations de phosphorylation non-significatives par rapport au contrôle.

7. BIBLIOGRAPHIE

- Adayev, T., Chen-Hwang, M.-C., Murakami, N., Wang, R., and Hwang, Y.-W. (2006). MNB/DYRK1A phosphorylation regulates the interactions of synaptojanin 1 with endocytic accessory proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *351*, 1060–1065.
- Ahmed, M.Y., Chioza, B.A., Rajab, A., Schmitz-Abe, K., Al-Khayat, A., Al-Turki, S., Baple, E.L., Patton, M.A., Al-Memar, A.Y., Hurlles, M.E., et al. (2015). Loss of PCLO function underlies pontocerebellar hypoplasia type III. *Neurology* *84*, 1745.
- 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*, 463–472.
- Airaksinen, M.M., Lecklin, A., Saano, V., Tuomisto, L., and Gynther, J. (1987). Tremorigenic Effect and Inhibition of Tryptamine and Serotonin Receptor Binding by β -Carbolines. *Basic Amp Clin. Pharmacol. Amp Toxicol.* *60*, 5–8.
- Aksoy-Aksel, A., and Manahan-Vaughan, D. (2013). The temporoammonic input to the hippocampal CA1 region displays distinctly different synaptic plasticity compared to the Schaffer collateral input in vivo: significance for synaptic information processing. *Front. Synaptic Neurosci.* *5*.
- Albasser, M.M., Poirier, G.L., and Aggleton, J.P. (2010). Qualitatively different modes of perirhinal–hippocampal engagement when rats explore novel vs. familiar objects as revealed by c-Fos imaging. *Eur. J. Neurosci.* *31*, 134–147.
- Albores, R., Neafsey, E.J., Drucker, G., Fields, J.Z., and Collins, M.A. (1990). Mitochondrial respiratory inhibition by N-methylated beta-carboline derivatives structurally resembling N-methyl-4-phenylpyridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 9368.
- Ally, S., Jolly, A.L., and Gelfand, V.I. (2008). Motor-cargo release: CaMKII as a traffic cop. *Nat. Cell Biol.* *10*, 3–5.
- Altafaj, X., Dierssen, M., Baamonde, C., Martí, E., Visa, J., Guimerà, J., Oset, M., González, J.R., Flórez, J., Fillat, C., et al. (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*, 1915–1923.
- Altafaj, X., Martín, E.D., Ortiz-Abalia, J., Valderrama, A., Lao-Peregrín, C., Dierssen, M., and Fillat, C. (2013). Normalization of Dyrk1A expression by AAV2/1-shDyrk1A attenuates hippocampal-dependent defects in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Neurobiol. Dis.* *52*, 117–127.
- Alvarez, M., Altafaj, X., Aranda, S., and Luna, S. de la (2007). DYRK1A Autophosphorylation on Serine Residue 520 Modulates Its Kinase Activity via 14-3-3 Binding. *Mol. Biol. Cell* *18*, 1167–1178.
- Andrade-Talavera, Y., Benito, I., Casañas, J.J., Rodríguez-Moreno, A., and Montesinos, M.L. (2015). Rapamycin restores BDNF-LTP and the persistence of long-term memory in a model of Down's syndrome. *Neurobiol. Dis.* *82*, 516–525.

- 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, 725–738.
- Aranda, S., Laguna, A., and Luna, S. de la (2011). DYRK family of protein kinases: evolutionary relationships, biochemical properties, and functional roles. *FASEB J.* 25, 449–462.
- Arqué, G., Fotaki, V., Fernández, D., Lagrán, M.M. de, Arbonés, M.L., and Dierssen, M. (2008). Impaired Spatial Learning Strategies and Novel Object Recognition in Mice Haploinsufficient for the Dual Specificity Tyrosine-Regulated Kinase-1A (Dyrk1A). *PLOS ONE* 3, e2575.
- 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., et al. (2006). NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature* 441, 595–600.
- Aylward, E.H., Li, Q., Honeycutt, N.A., Warren, A.C., Pulsifer, M.B., Barta, P.E., Chan, M.D., Smith, P.D., Jerram, M., and Pearlson, G.D. (1999). MRI Volumes of the Hippocampus and Amygdala in Adults With Down's Syndrome With and Without Dementia. *Am. J. Psychiatry*.
- Baddeley, A. (2010). Working memory. *Curr. Biol.* 20, R136–R140.
- Baddeley, A., and Jarrold, C. (2007). Working memory and Down syndrome. *J. Intellect. Disabil. Res.* 51, 925–931.
- Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C.J., Mclauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J.S.C., Alessi, D.R., and Cohen, P. (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem. J.* 408, 297–315.
- Barlow, G.M., Chen, X.-N., Shi, Z.Y., Lyons, G.E., Kurnit, D.M., Celle, L., Spinner, N.B., Zackai, E., Pettenati, M.J., Riper, A.J.V., et al. (2001). Down syndrome congenital heart disease: A narrowed region and a candidate gene. *Genet. Med.* 3, 91–101.
- Baxter, L.L., Moran, T.H., Richtsmeier, J.T., Troncoso, J., and Reeves, R.H. (2000). Discovery and genetic localization of Down syndrome cerebellar phenotypes using the Ts65Dn mouse. *Hum. Mol. Genet.* 9, 195–202.
- Belichenko, P.V., Masliah, E., Kleschevnikov, A.M., Villar, A.J., Epstein, C.J., Salehi, A., and Mobley, W.C. (2004). Synaptic structural abnormalities in the Ts65Dn mouse model of down syndrome. *J. Comp. Neurol.* 480, 281–298.
- 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, 329–345.
- Benavides-Piccione, R., Dierssen, M., Ballesteros-Yáñez, I., Martínez de Lagrán, M., Arbonés, M.L., Fotaki, V., DeFelipe, J., and Elston, G.N. (2005). Alterations in the phenotype of neocortical pyramidal cells in the Dyrk1A^{+/-} mouse. *Neurobiol. Dis.* 20, 115–122.

- Benfenati, F., Valtorta, F., and Greengard, P. (1991). Computer modeling of synapsin I binding to synaptic vesicles and F-actin: implications for regulation of neurotransmitter release. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *88*, 575–579.
- Benfenati, F., Valtorta, F., Rubenstein, J.L., Gorelick, F.S., Greengard, P., and Czernik, A.J. (1992). Synaptic vesicle-associated Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is a binding protein for synapsin I. *Nature* *359*, 417–420.
- Book, L., Hart, A., Black, J., Feolo, M., Zone, J.J., and Neuhausen, S.L. (2001). Prevalence and clinical characteristics of celiac disease in Down syndrome in a U.S. study. *Am. J. Med. Genet. A.* *98*, 70–74.
- Borella, E., Carretti, B., and Lanfranchi, S. (2013). Inhibitory mechanisms in Down syndrome: Is there a specific or general deficit? *Res. Dev. Disabil.* *34*, 65–71.
- Brierley, D.I., and Davidson, C. (2012). Developments in harmine pharmacology — Implications for ayahuasca use and drug-dependence treatment. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* *39*, 263–272.
- Broadbent, N.J., Squire, L.R., and Clark, R.E. (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 14515–14520.
- Buffalo, E.A., Bellgowan, P.S.F., and Martin, A. (2006). Distinct roles for medial temporal lobe structures in memory for objects and their locations. *Learn. Mem.* *13*, 638.
- Bull, M.J., and Genetics, the C. on (2011). Health Supervision for Children With Down Syndrome. *Pediatrics* *128*, 393–406.
- Bush, A., and Beail, N. Risk Factors for Dementia in People With Down Syndrome: Issues in Assessment and Diagnosis. *Am. J. Ment. Retard.* *109*.
- C, C.-L., B, V., Am, G., U, A., K, T., S, K., Rw, V., P, D.C., Ed, G., and Cc, G. (1996). Piccolo, a novel 420 kDa protein associated with the presynaptic cytomatrix. *Eur. J. Cell Biol.* *69*, 214–223.
- C, C.-M., Cb, M., and Ca, M. (1985). Early vocabulary acquisition by children with Down syndrome. *Am. J. Ment. Defic.* *90*, 177–184.
- Callaway, J.C., McKenna, D.J., Grob, C.S., Brito, G.S., Raymon, L.P., Poland, R.E., Andrade, E.N., Andrade, E.O., and Mash, D.C. (1999). Pharmacokinetics of Hoasca alkaloids in healthy humans. *J. Ethnopharmacol.* *65*, 243–256.
- Canfield, M.A., Honein, M.A., Yuskiv, N., Xing, J., Mai, C.T., Collins, J.S., Devine, O., Petrini, J., Ramadhani, T.A., Hobbs, C.A., et al. (2006). National estimates and race/ethnic-specific variation of selected birth defects in the United States, 1999–2001. *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* *76*, 747–756.
- Canto, C.B., Wouterlood, F.G., and Witter, M.P. (2008). What Does the Anatomical Organization of the Entorhinal Cortex Tell Us?
- Canzonetta, C., Mulligan, C., Deutsch, S., Ruf, S., O’Doherty, A., Lyle, R., Borel, C., Lin-Marq, N., Delom, F., Groet, J., et al. (2008). DYRK1A-Dosage Imbalance Perturbs

- NRSF/REST Levels, Deregulating Pluripotency and Embryonic Stem Cell Fate in Down Syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 83, 388–400.
- Carlesimo, G.A., Marotta, L., and Vicari, S. (1997). Long-term memory in mental retardation: Evidence for a specific impairment in subjects with Down's syndrome. *Neuropsychologia* 35, 71–79.
- Carr, J. (2005). Stability and change in cognitive ability over the life span: a comparison of populations with and without Down's syndrome. *J. Intellect. Disabil. Res.* 49, 915–928.
- Catuara-Solarz, S., Espinosa-Carrasco, J., Erb, I., Langohr, K., Notredame, C., Gonzalez, J.R., and Dierssen, M. (2015). Principal Component Analysis of the Effects of Environmental Enrichment and (-)-epigallocatechin-3-gallate on Age-Associated Learning Deficits in a Mouse Model of Down Syndrome. *Front. Behav. Neurosci.* 9.
- Cesca, F., Baldelli, P., Valtorta, F., and Benfenati, F. (2010a). The synapsins: Key actors of synapse function and plasticity. *Prog. Neurobiol.* 91, 313–348.
- Cesca, F., Baldelli, P., Valtorta, F., and Benfenati, F. (2010b). The synapsins: Key actors of synapse function and plasticity. *Prog. Neurobiol.* 91, 313–348.
- Chen, J.-Y., Lin, J.-R., Tsai, F.-C., and Meyer, T. (2013). Dosage of Dyrk1a Shifts Cells within a p21-Cyclin D1 Signaling Map to Control the Decision to Enter the Cell Cycle. *Mol. Cell* 52, 87–100.
- Church, R.J., Gatti, D.M., Urban, T.J., Long, N., Yang, X., Shi, Q., Eaddy, J.S., Mosedale, M., Ballard, S., Churchill, G.A., et al. (2015). Sensitivity to hepatotoxicity due to epigallocatechin gallate is affected by genetic background in diversity outbred mice. *Food Chem. Toxicol.* 76, 19–26.
- Coulter, D.A., Yue, C., Ang, C.W., Weissinger, F., Goldberg, E., Hsu, F.-C., Carlson, G.C., and Takano, H. (2011). Hippocampal microcircuit dynamics probed using optical imaging approaches. *J. Physiol.* 589, 1893.
- Courcet, J.-B., Faivre, L., Malzac, P., Masurel-Paulet, A., Lopez, E., Callier, P., Lambert, L., Lemesle, M., Thevenon, J., Gigot, N., et al. (2012). The DYRK1A gene is a cause of syndromic intellectual disability with severe microcephaly and epilepsy. *J. Med. Genet.* 49, 731–736.
- Creavin, A.L., and Brown, R.D. (2009). Ophthalmic Abnormalities in Children With Down Syndrome. *J. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus* 46, 76–82.
- Day, S.M., Strauss, D.J., Shavelle, R.M., and Reynolds, R.J. (2005). Mortality and causes of death in persons with Down syndrome in California. *Dev. Med. Child Neurol.* 47, 171–176.
- Debdab, M., Carreaux, F., Renault, S., Soundararajan, M., Fedorov, O., Filippakopoulos, P., Lozach, O., Babault, L., Tahtouh, T., Baratte, B., et al. (2011). Leucettines, a Class of Potent Inhibitors of cdc2-Like Kinases and Dual Specificity, Tyrosine Phosphorylation Regulated Kinases Derived from the Marine Sponge Leucettamine B: Modulation of Alternative Pre-RNA Splicing.

Delabar, J., Blouin, J., and Rahmani, Z. Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG*.

Dennis, J., Archer, N., Ellis, J., and Marder, L. (2010). Recognising heart disease in children with Down syndrome. *Arch. Dis. Child. - Educ. Pract.* 95, 98–104.

Desai, A., Verma, S., Mitchison, T.J., and Walczak, C.E. (1999). Kin I Kinesins Are Microtubule-Destabilizing Enzymes. *Cell* 96, 69–78.

Dowjat, W.K., Adayev, T., Kuchna, I., Nowicki, K., Palminiello, S., Hwang, Y.W., and Wegiel, J. (2007). Trisomy-driven overexpression of DYRK1A kinase in the brain of subjects with Down syndrome. *Neurosci. Lett.* 413, 77–81.

Duchon, A., and Herault, Y. (2016). DYRK1A, a Dosage-Sensitive Gene Involved in Neurodevelopmental Disorders, Is a Target for Drug Development in Down Syndrome. *Front. Behav. Neurosci.* 10.

Duchon, A., Raveau, M., Chevalier, C., Nalesso, V., Sharp, A.J., and Herault, Y. (2011). Identification of the translocation breakpoints in the Ts65Dn and Ts1Cje mouse lines: relevance for modeling down syndrome. *Mamm. Genome* 22, 674–684.

Duigou, C.L., Simonnet, J., Teleńczuk, M.T., Fricker, D., and Miles, R. (2013). Recurrent synapses and circuits in the CA3 region of the hippocampus: an associative network. *Front. Cell. Neurosci.* 7.

Esquirol, É. (1772-1840) (1838). *Des maladies mentales : considérées sous les rapports médical, hygiénique et médico-légal.* [Volume 2] / par E. Esquirol,...

Fabia, J., and Drolette, M. (1970). MALFORMATIONS AND LEUKEMIA IN CHILDREN WITH DOWN'S SYNDROME. *Pediatrics* 45, 60–70.

Fant, X., Durieu, E., Chicanne, G., Payrastre, B., Sbrissa, D., Shisheva, A., Limanton, E., Carreaux, F., Bazureau, J.-P., and Meijer, L. (2014). cdc-Like/Dual-Specificity Tyrosine Phosphorylation–Regulated Kinases Inhibitor Leucettine L41 Induces mTOR-Dependent Autophagy: Implication for Alzheimer's Disease. *Mol. Pharmacol.* 85, 441–450.

Fassio, A., Patry, L., Congia, S., Onofri, F., Piton, A., Gauthier, J., Pozzi, D., Messa, M., Defranchi, E., Fadda, M., et al. (2011). SYN1 loss-of-function mutations in autism and partial epilepsy cause impaired synaptic function. *Hum. Mol. Genet.* 20, 2297–2307.

Fenster, S.D., Kessels, M.M., Qualmann, B., Chung, W.J., Nash, J., Gundelfinger, E.D., and Garner, C.C. (2003). Interactions between Piccolo and the Actin/Dynammin-binding Protein Abp1 Link Vesicle Endocytosis to Presynaptic Active Zones. *J. Biol. Chem.* 278, 20268–20277.

Foster, K.A., McLaughlin, N., Edbauer, D., Phillips, M., Bolton, A., Constantine-Paton, M., and Sheng, M. (2010). Distinct roles of NR2A and NR2B cytoplasmic tails in long term potentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 2676.

Fotaki, V., Dierssen, M., Alcántara, S., Martínez, S., Martí, E., Casas, C., Visa, J., Soriano, E., Estivill, X., and Arbonés, M.L. (2002a). Dyrk1A Haploinsufficiency Affects Viability and

Causes Developmental Delay and Abnormal Brain Morphology in Mice. *Mol. Cell. Biol.* 22, 6636–6647.

Fotaki, V., Dierssen, M., Alcántara, S., Martínez, S., Martí, E., Casas, C., Visa, J., Soriano, E., Estivill, X., and Arbonés, M.L. (2002b). Dyrk1A Haploinsufficiency Affects Viability and Causes Developmental Delay and Abnormal Brain Morphology in Mice. *Mol. Cell. Biol.* 22, 6636–6647.

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, 213–217.

Freund, T.F., Katona, I., and Piomelli, D. (2003a). Role of Endogenous Cannabinoids in Synaptic Signaling. *Physiol. Rev.* 83, 1017–1066.

Freund, T.F., Katona, I., and Piomelli, D. (2003b). Role of Endogenous Cannabinoids in Synaptic Signaling. *Physiol. Rev.* 83, 1017–1066.

Frost, D., Meechoovet, B., Wang, T., Gately, S., Giorgetti, M., Shcherbakova, I., and Dunckley, T. (2011). β -Carboline Compounds, Including Harmine, Inhibit DYRK1A and Tau Phosphorylation at Multiple Alzheimer's Disease-Related Sites. *PLOS ONE* 6, e19264.

Fuentes, J.A., and Longo, V.G. (1971). An investigation on the central effects of harmine, harmaline and related β -carbolines. *Neuropharmacology* 10, 15–23.

Garcia, C.C., Blair, H.J., Seager, M., Coulthard, A., Tennant, S., Buddles, M., Curtis, A., and Goodship, J.A. (2004). Identification of a mutation in synapsin I, a synaptic vesicle protein, in a family with epilepsy. *J. Med. Genet.* 41, 183–186.

García-Cerro, S., Martínez, P., Vidal, V., Corrales, A., Flórez, J., Vidal, R., Rueda, N., Arbonés, M.L., and Martínez-Cué, C. (2014a). Overexpression of Dyrk1A Is Implicated in Several Cognitive, Electrophysiological and Neuromorphological Alterations Found in a Mouse Model of Down Syndrome. *PLOS ONE* 9, e106572.

García-Cerro, S., Martínez, P., Vidal, V., Corrales, A., Flórez, J., Vidal, R., Rueda, N., Arbonés, M.L., and Martínez-Cué, C. (2014b). Overexpression of Dyrk1A Is Implicated in Several Cognitive, Electrophysiological and Neuromorphological Alterations Found in a Mouse Model of Down Syndrome. *PLOS ONE* 9, e106572.

Garner, C.C., Kindler, S., and Gundelfinger, E.D. (2000). Molecular determinants of presynaptic active zones. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 321–327.

Gathercole, S.E., and Baddeley, A.D. (1990). Phonological memory deficits in language disordered children: Is there a causal connection? *J. Mem. Lang.* 29, 336–360.

Geggel, R.L., O'Brien, J.E., and Feingold, M. (1993). Development of valve dysfunction in adolescents and young adults with down syndrome and no known congenital heart disease. *J. Pediatr.* 122, 821–823.

Ginsberg, S.D., and Che, S. (2005). Expression profile analysis within the human hippocampus: Comparison of CA1 and CA3 pyramidal neurons. *J. Comp. Neurol.* 487, 107–118.

- Glasson, E., Sullivan, S., Hussain, R., Petterson, B., Montgomery, P., and Bittles, A. (2002). The changing survival profile of people with Down's syndrome: implications for genetic counselling. *Clin. Genet.* *62*, 390–393.
- Göckler, N., Jofre, G., Papadopoulos, C., Soppa, U., Tejedor, F.J., and Becker, W. (2009a). Harmine specifically inhibits protein kinase DYRK1A and interferes with neurite formation. *FEBS J.* *276*, 6324–6337.
- Göckler, N., Jofre, G., Papadopoulos, C., Soppa, U., Tejedor, F.J., and Becker, W. (2009b). Harmine specifically inhibits protein kinase DYRK1A and interferes with neurite formation. *FEBS J.* *276*, 6324–6337.
- Göckler, N., Jofre, G., Papadopoulos, C., Soppa, U., Tejedor, F.J., and Becker, W. (2009c). Harmine specifically inhibits protein kinase DYRK1A and interferes with neurite formation. *FEBS J.* *276*, 6324–6337.
- Goodliffe, J.W., Olmos-Serrano, J.L., Aziz, N.M., Pennings, J.L.A., Guedj, F., Bianchi, D.W., and Haydar, T.F. (2016). Absence of Prenatal Forebrain Defects in the Dp(16)1Yey/+ Mouse Model of Down Syndrome. *J. Neurosci.* *36*, 2926–2944.
- Graaf, K. de, Czajkowska, H., Rottmann, S., Packman, L.C., Lilischkis, R., Lüscher, B., and Becker, W. (2006a). The protein kinase DYRK1A phosphorylates the splicing factor SF3b1/SAP155 at Thr434, a novel in vivo phosphorylation site. *BMC Biochem.* *7*, 7.
- Graaf, K. de, Czajkowska, H., Rottmann, S., Packman, L.C., Lilischkis, R., Lüscher, B., and Becker, W. (2006b). The protein kinase DYRK1A phosphorylates the splicing factor SF3b1/SAP155 at Thr434, a novel in vivo phosphorylation site. *BMC Biochem.* *7*, 7.
- van der Graaf, F.H.C.E., de Jong, B.M., Maguire, R.P., Meiners, L.C., and Leenders, K.L. (2004). Cerebral activation related to skills practice in a double serial reaction time task: striatal involvement in random-order sequence learning. *Cogn. Brain Res.* *20*, 120–131.
- Grau, C., Arató, K., Fernández-Fernández, J.M., Valderrama, A., Sindreu, C., Fillat, C., Ferrer, I., de la Luna, S., and Altafaj, X. (2014). DYRK1A-mediated phosphorylation of GluN2A at Ser1048 regulates the surface expression and channel activity of GluN1/GluN2A receptors. *Front. Cell. Neurosci.* *8*.
- Guedj, F., Sébrié, C., Rivals, I., Ledru, A., Paly, E., Bizot, J.C., Smith, D., Rubin, E., Gillet, B., Arbones, M., et al. (2009). Green Tea Polyphenols Rescue of Brain Defects Induced by Overexpression of DYRK1A. *PLOS ONE* *4*, e4606.
- Guedj, F., Pereira, P.L., Najas, S., Barallobre, M.-J., Chabert, C., Souchet, B., Sebrié, C., Verney, C., Herault, Y., Arbones, M., et al. (2012). DYRK1A: A master regulatory protein controlling brain growth. *Neurobiol. Dis.* *46*, 190–203.
- Guidi, S., Bonasoni, P., Ceccarelli, C., Santini, D., Gualtieri, F., Ciani, E., and Bartesaghi, R. (2008). RESEARCH ARTICLE: Neurogenesis Impairment and Increased Cell Death Reduce Total Neuron Number in the Hippocampal Region of Fetuses with Down Syndrome. *Brain Pathol.* *18*, 180–197.
- Guillaud, L., Setou, M., and Hirokawa, N. (2003). KIF17 Dynamics and Regulation of NR2B Trafficking in Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.* *23*, 131–140.

- Guo, X., Williams, J.G., Schug, T.T., and Li, X. (2010). DYRK1A and DYRK3 Promote Cell Survival through Phosphorylation and Activation of SIRT1. *J. Biol. Chem.* 285, 13223–13232.
- Hamada, T., Gejyo, F., Koshino, Y., Murata, T., Omori, M., Nishio, M., Misawa, T., and Isaki, K. (1998). Echocardiographic Evaluation of Cardiac Valvular Abnormalities in Adults with Down's Syndrome. *Tohoku J. Exp. Med.* 185, 31–35.
- Hamilton, C. (1993). Investigation of the articulatory patterns of young adults with Down syndrome using electropalatography. *Syndr. Res. Pract.* 1, 15–28.
- Hattori, M., Fujiyama, A., Taylor, T.D., Watanabe, H., Yada, T., Park, H.-S., Toyoda, A., Ishii, K., Totoki, Y., Choi, D.-K., et al. (2000). The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* 405, 311–319.
- Head, E., and Lott, I.T. (2004). Down syndrome and beta-amyloid deposition. *Curr. Opin. Neurol.* 17, 95–100.
- Herauld, Y., Delabar, J.M., Fisher, E.M.C., Tybulewicz, V.L.J., Yu, E., and Brault, V. (2017). Rodent models in Down syndrome research: impact and future opportunities. *Dis. Model. Mech.* 10, 1165–1186.
- Hestnes, A., Sand, T., and Fostad, K. (1991). Ocular findings in Down's syndrome. *J. Intellect. Disabil. Res.* 35, 194–203.
- Himpel, S., Tegge, W., Frank, R., Leder, S., Joost, H.-G., and Becker, W. (2000). Specificity Determinants of Substrate Recognition by the Protein Kinase DYRK1A. *J. Biol. Chem.* 275, 2431–2438.
- Himpel, S., Panzer, P., Eirimbter, K., Czajkowska, H., Sayed, M., Packman, L.C., Blundell, T., Kentrup, H., Grötzinger, J., Joost, H.-G., et al. (2001). Identification of the autophosphorylation sites and characterization of their effects in the protein kinase DYRK1A. *Biochem. J.* 359, 497–505.
- Homma, N., Takei, Y., Tanaka, Y., Nakata, T., Terada, S., Kikkawa, M., Noda, Y., and Hirokawa, N. (2003a). Kinesin Superfamily Protein 2A (KIF2A) Functions in Suppression of Collateral Branch Extension. *Cell* 114, 229–239.
- Homma, N., Takei, Y., Tanaka, Y., Nakata, T., Terada, S., Kikkawa, M., Noda, Y., and Hirokawa, N. (2003b). Kinesin Superfamily Protein 2A (KIF2A) Functions in Suppression of Collateral Branch Extension. *Cell* 114, 229–239.
- Illingworth, R.S. (1959). CONVULSIONS IN MENTALLY RETARDED CHILDREN WITH OR WITHOUT CEREBRAL PALSY. *J. Intellect. Disabil. Res.* 3, 88–93.
- Inglis, A., Lohn, Z., Austin, J.C., and Hippman, C. (2014). A “cure” for Down syndrome: what do parents want? *Clin. Genet.* 86, 310–317.
- Ishizuka, N., Cowan, W.M., and Amaral, D.G. (1995). A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 362, 17–45.

- Iverson, J.M., Longobardi, E., and Caselli, M.C. (2003). Relationship between gestures and words in children with Down's syndrome and typically developing children in the early stages of communicative development. *Int. J. Lang. Amp Commun. Disord.* 38, 179–197.
- Jernigan, T.L., Bellugi, U., Sowell, E., Doherty, S., and Hesselink, J.R. (1993). Cerebral Morphologic Distinctions Between Williams and Down Syndromes. *Arch. Neurol.* 50, 186–191.
- Jiang, X., Liu, C., Yu, T., Zhang, L., Meng, K., Xing, Z., Belichenko, P.V., Kleschevnikov, A.M., Pao, A., Peresie, J., et al. (2015). Genetic dissection of the Down syndrome critical region. *Hum. Mol. Genet.* 24, 6540–6551.
- Johannsen, P., Christensen, J.E.J., Goldstein, H., Kamp Nielsen, V., and Mai, J. (1996). Epilepsy in Down syndrome—prevalence in three age groups. *Seizure* 5, 121–125.
- Jung, M.-S., Park, J.-H., Ryu, Y.S., Choi, S.-H., Yoon, S.-H., Kwen, M.-Y., Oh, J.Y., Song, W.-J., and Chung, S.-H. (2011). Regulation of RCAN1 Protein Activity by Dyrk1A Protein-mediated Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 286, 40401–40412.
- Kajiwara, R., Wouterlood, F.G., Sah, A., Boekel, A.J., Bulte, B., T.g, L., and Witter, M.P. (2008). Convergence of entorhinal and CA3 inputs onto pyramidal neurons and interneurons in hippocampal area CA1—An anatomical study in the rat. *Hippocampus* 18, 266–280.
- Kelly, P.A., and Rahmani, Z. (2005). DYRK1A Enhances the Mitogen-activated Protein Kinase Cascade in PC12 Cells by Forming a Complex with Ras, B-Raf, and MEK1. *Mol. Biol. Cell* 16, 3562–3573.
- Kennedy, M.B. (2000). Signal-Processing Machines at the Postsynaptic Density. *Science* 290, 750–754.
- Khan, N., Afaq, F., Saleem, M., Ahmad, N., and Mukhtar, H. (2006). Targeting Multiple Signaling Pathways by Green Tea Polyphenol (–)-Epigallocatechin-3-Gallate. *Cancer Res.* 66, 2500–2505.
- Kii, I., Sumida, Y., Goto, T., Sonamoto, R., Okuno, Y., Yoshida, S., Kato-Sumida, T., Koike, Y., Abe, M., Nonaka, Y., et al. (2016). Selective inhibition of the kinase DYRK1A by targeting its folding process. *Nat. Commun.* 7, ncomms11391.
- Kim, H., Sablin, S.O., and Ramsay, R.R. (1997). Inhibition of Monoamine Oxidase A by β -Carboline Derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* 337, 137–142.
- Kim, H., Lee, K.-S., Kim, A.-K., Choi, M., Choi, K., Kang, M., Chi, S.-W., Lee, M.-S., Lee, J.-S., Lee, S.-Y., et al. (2016). A chemical with proven clinical safety rescues Down-syndrome-related phenotypes in through DYRK1A inhibition. *Dis. Model. Mech.* 9, 839–848.
- Kim, M.-Y., Jeong, B.C., Lee, J.H., Kee, H.J., Kook, H., Kim, N.S., Kim, Y.H., Kim, J.-K., Ahn, K.Y., and Kim, K.K. (2006). A repressor complex, AP4 transcription factor and geminin, negatively regulates expression of target genes in nonneuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 13074–13079.
- Kim, Y., Park, J., Song, W.-J., and Chang, S. (2010). Overexpression of Dyrk1A Causes the Defects in Synaptic Vesicle Endocytosis. *Neurosignals* 18, 164–172.

- Kimura, R., Kamino, K., Yamamoto, M., Nuripa, A., Kida, T., Kazui, H., Hashimoto, R., Tanaka, T., Kudo, T., Yamagata, H., et al. (2007). The DYRK1A gene, encoded in chromosome 21 Down syndrome critical region, bridges between β -amyloid production and tau phosphorylation in Alzheimer disease. *Hum. Mol. Genet.* *16*, 15–23.
- Kivivuori, S.M., Rajantie, J., and Siimes, M.A. (1996). Peripheral blood cell counts in infants with Down's syndrome. *Clin. Genet.* *49*, 15–19.
- Klink, R., and Alonso, A. (1997). Morphological characteristics of layer II projection neurons in the rat medial entorhinal cortex. *Hippocampus* *7*, 571–583.
- Kohansal-Nodehi, M., Chua, J.J., Urlaub, H., Jahn, R., and Czernik, D. (2016). Analysis of protein phosphorylation in nerve terminal reveals extensive changes in active zone proteins upon exocytosis. *eLife* *5*, e14530.
- Koo, B.K.K., Blaser, S., Harwood-Nash, D., Becker, L.E., and Murphy, E.G. (2016). Magnetic Resonance Imaging Evaluation of Delayed Myelination in Down Syndrome: A Case Report and Review of the Literature. *J. Child Neurol.*
- Korenberg, J.R., Kawashima, H., Pulst, S.-M., Ikeuchi, T., Ogasawara, N., Yamamoto, K., Schonberg, S.A., West, R., Allen, L., Magenis, E., et al. (1990). Molecular definition of a region of chromosome 21 that causes features of the Down syndrome phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* *47*, 236–246.
- Korte, G., Dreiseitel, A., Schreier, P., Oehme, A., Locher, S., Geiger, S., Heilmann, J., and Sand, P.G. (2010). Tea catechins' affinity for human cannabinoid receptors. *Phytomedicine* *17*, 19–22.
- Kurabayashi, N., and Sanada, K. (2013). Increased dosage of DYRK1A and DSCR1 delays neuronal differentiation in neocortical progenitor cells. *Genes Dev.* *27*, 2708–2721.
- Laguna, A., Aranda, S., Barallobre, M.J., Barhoum, R., Fernández, E., Fotaki, V., Delabar, J.M., de la Luna, S., de la Villa, P., and Arbonés, M.L. (2008). The Protein Kinase DYRK1A Regulates Caspase-9-Mediated Apoptosis during Retina Development. *Dev. Cell* *15*, 841–853.
- Landry, O., Russo, N., Dawkins, T., Zelazo, P.D., and Burack, J.A. (2012). The Impact of Verbal and Nonverbal Development on Executive Function in Down Syndrome and Williams Syndrome. *J. Dev. Disabil.* *18*.
- Lanfranchi, S., Cornoldi, C., and Vianello, R. (2009). Verbal and Visuospatial Working Memory Deficits in Children With Down Syndrome.
- Lanfranchi, S., Jerman, O., Dal Pont, E., Alberti, A., and Vianello, R. (2010). Executive function in adolescents with Down Syndrome. *J. Intellect. Disabil. Res.* *54*, 308–319.
- Lange, B. (2000). The Management of Neoplastic Disorders of Haematopoeisis in Children with Down's Syndrome. *Br. J. Haematol.* *110*, 512–524.
- Leal-Ortiz, S., Waites, C.L., Terry-Lorenzo, R., Zamorano, P., Gundelfinger, E.D., and Garner, C.C. (2008). Piccolo modulation of Synapsin1a dynamics regulates synaptic vesicle exocytosis. *J. Cell Biol.* *181*, 831.

- Lee, Y., Ha, J., Kim, H.J., Kim, Y.-S., Chang, E.-J., Song, W.-J., and Kim, H.-H. (2009). Negative Feedback Inhibition of NFATc1 by DYRK1A Regulates Bone Homeostasis. *J. Biol. Chem.* 284, 33343–33351.
- Li, D., Jackson, R.A., Yusoff, P., and Guy, G.R. (2010). Direct Association of Sprouty-related Protein with an EVH1 Domain (SPRED) 1 or SPRED2 with DYRK1A Modifies Substrate/Kinase Interactions. *J. Biol. Chem.* 285, 35374–35385.
- Li, Z., Yu, T., Morishima, M., Pao, A., LaDuca, J., Conroy, J., Nowak, N., Matsui, S.-I., Shiraishi, I., and Yu, Y.E. (2007). Duplication of the entire 22.9 Mb human chromosome 21 syntenic region on mouse chromosome 16 causes cardiovascular and gastrointestinal abnormalities. *Hum. Mol. Genet.* 16, 1359–1366.
- Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., and Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402, 672–676.
- Liao, G.-Y., Wagner, D.A., Hsu, M.H., and Leonard, J.P. (2001). Evidence for Direct Protein Kinase-C Mediated Modulation of N-Methyl-D-aspartate Receptor Current. *Mol. Pharmacol.* 59, 960–964.
- Liu, F., Liang, Z., Wegiel, J., Hwang, Y.-W., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Ramakrishna, N., and Gong, C.-X. (2008). Overexpression of Dyrk1A contributes to neurofibrillary degeneration in Down syndrome. *FASEB J.* 22, 3224.
- Llinás, R., McGuinness, T.L., Leonard, C.S., Sugimori, M., and Greengard, P. (1985). Intraterminal injection of synapsin I or calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alters neurotransmitter release at the squid giant synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 3035.
- Llinás, R., Gruner, J.A., Sugimori, M., McGuinness, T.L., and Greengard, P. (1991). Regulation by synapsin I and Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II of the transmitter release in squid giant synapse. *J. Physiol.* 436, 257.
- Lochhead, P.A., Sibbet, G., Morrice, N., and Cleghon, V. (2005). Activation-Loop Autophosphorylation Is Mediated by a Novel Transitional Intermediate Form of DYRKs. *Cell* 121, 925–936.
- Lu, M., Zheng, L., Han, B., Wang, L., Wang, P., Liu, H., and Sun, X. (2011). REST Regulates DYRK1A Transcription in a Negative Feedback Loop. *J. Biol. Chem.* 286, 10755–10763.
- Maenz, B., Hekerman, P., Vela, E.M., Galceran, J., and Becker, W. (2008). Characterization of the human DYRK1A promoter and its regulation by the transcription factor E2F1. *BMC Mol. Biol.* 9, 30.
- Mai, C.T., Kucik, J.E., Isenburg, J., Feldkamp, M.L., Marengo, L.K., Bugenske, E.M., Thorpe, P.G., Jackson, J.M., Correa, A., Rickard, R., et al. (2013). Selected Birth Defects Data from Population-Based Birth Defects Surveillance Programs in the United States, 2006 to 2010: Featuring Trisomy Conditions. *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 97, 709.

- Marchal, J.P., Maurice-Stam, H., Houtzager, B.A., Rutgers van Rozenburg-Marres, S.L., Oostrom, K.J., Grootenhuis, M.A., and van Trotsenburg, A.S.P. (2016). Growing up with Down syndrome: Development from 6 months to 10.7 years. *Res. Dev. Disabil.* *59*, 437–450.
- Marland, J.R.K., Smillie, K.J., and Cousin, M.A. (2016). Synaptic Vesicle Recycling Is Unaffected in the Ts65Dn Mouse Model of Down Syndrome. *PLoS ONE* *11*.
- Martinez de Lagran, M., Benavides-Piccione, R., Ballesteros-Yañez, I., Calvo, M., Morales, M., Fillat, C., DeFelipe, J., Ramakers, G.J.A., and Dierssen, M. (2012). Dyrk1A Influences Neuronal Morphogenesis Through Regulation of Cytoskeletal Dynamics in Mammalian Cortical Neurons. *Cereb. Cortex* *22*, 2867–2877.
- Martí, E., Altafaj, X., Dierssen, M., de la Luna, S., Fotaki, V., Alvarez, M., Pérez-Riba, M., Ferrer, I., and Estivill, X. (2003). Dyrk1A expression pattern supports specific roles of this kinase in the adult central nervous system. *Brain Res.* *964*, 250–263.
- Martínez de Lagrán, M., Altafaj, X., Gallego, X., Martí, E., Estivill, X., Sahún, I., Fillat, C., and Dierssen, M. (2004). Motor phenotypic alterations in TgDyrk1a transgenic mice implicate DYRK1A in Down syndrome motor dysfunction. *Neurobiol. Dis.* *15*, 132–142.
- Mazzanti, G., Menniti-Ippolito, F., Moro, P.A., Cassetti, F., Raschetti, R., Santuccio, C., and Mastrangelo, S. (2009). Hepatotoxicity from green tea: a review of the literature and two unpublished cases. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* *65*, 331–341.
- McDowell, K.M., and Craven, D.I. (2011). Pulmonary Complications of Down Syndrome during Childhood. *J. Pediatr.* *158*, 319–325.
- McElyea, S.D., Starbuck, J.M., Tumbleson-Brink, D.M., Harrington, E., Blazek, J.D., Ghoneima, A., Kula, K., and Roper, R.J. (2016). Influence of prenatal EGCG treatment and Dyrk1a dosage reduction on craniofacial features associated with Down syndrome. *Hum. Mol. Genet.* *25*, 4856–4869.
- McLAUHLAN, H., Elliott, M., and Cohen, P. (2003). The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem. J.* *371*, 199–204.
- Melyn, M.A., and White, D.T. (1973). MENTAL AND DEVELOPMENTAL MILESTONES OF NONINSTITUTIONALIZED DOWN'S SYNDROME CHILDREN. *Pediatrics* *52*, 542–545.
- Møller, R.S., Kübart, S., Hoeltzenbein, M., Heye, B., Vogel, I., Hansen, C.P., Menzel, C., Ullmann, R., Tommerup, N., Ropers, H.-H., et al. (2008). Truncation of the Down Syndrome Candidate Gene DYRK1A in Two Unrelated Patients with Microcephaly. *Am. J. Hum. Genet.* *82*, 1165–1170.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D.J., Sakmann, B., and Seeburg, P.H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* *12*, 529–540.
- Moore, C.A., Cooper, J., Wagenbach, M., Ovechkina, Y., Wordeman, L., and Milligan, R.A. (2006). The Role of the Kinesin-13 Neck in Microtubule Depolymerization. *Cell Cycle*.

- Morita, K., Celso, C.L., Spencer-Dene, B., Zouboulis, C.C., and Watt, F.M. (2006). HAN11 binds mDia1 and controls GII1 transcriptional activity. *J. Dermatol. Sci.* 44, 11–20.
- Mumby, D.G., Gaskin, S., Glenn, M.J., Schramek, T.E., and Lehmann, H. (2002). Hippocampal Damage and Exploratory Preferences in Rats: Memory for Objects, Places, and Contexts. *Learn. Mem.* 9, 49.
- Murakami, N., Xie, W., Lu, R.C., Chen-Hwang, M.-C., Wieraszko, A., and Hwang, Y.W. (2006). Phosphorylation of Amphiphysin I by Minibrain Kinase/Dual-specificity Tyrosine Phosphorylation-regulated Kinase, a Kinase Implicated in Down Syndrome. *J. Biol. Chem.* 281, 23712–23724.
- Murakami, N., Bolton, D.C., Kida, E., Xie, W., and Hwang, Y.-W. (2012). Phosphorylation by Dyrk1A of Clathrin Coated Vesicle-Associated Proteins: Identification of the Substrate Proteins and the Effects of Phosphorylation. *PLOS ONE* 7, e34845.
- Murthy, S.K., Malhotra, A.K., Mani, S., Shara, M.E.A., Al-Rowaished, E.E.M., Naveed, S., AlKhayat, A.I., and AlAli, M.T. (2007). Incidence of Down Syndrome in Dubai, UAE. *Med. Princ. Pract.* 16, 25–28.
- Naert, G., Ferré, V., Meunier, J., Keller, E., Malmström, S., Givalois, L., Carreaux, F., Bazureau, J.-P., and Maurice, T. (2015). Leucettine L41, a DYRK1A-preferential DYRKs/CLKs inhibitor, prevents memory impairments and neurotoxicity induced by oligomeric A β 25–35 peptide administration in mice. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 25, 2170–2182.
- Najas, S., Arranz, J., Lochhead, P.A., Ashford, A.L., Oxley, D., Delabar, J.M., Cook, S.J., Barallobre, M.J., and Arbonés, M.L. (2015). DYRK1A-mediated Cyclin D1 Degradation in Neural Stem Cells Contributes to the Neurogenic Cortical Defects in Down Syndrome. *EBioMedicine* 2, 120–134.
- Nelson, L., Johnson, J.K., Freedman, M., Lott, I., Groot, J., Chang, M., Milgram, N.W., and Head, E. (2005). Learning and memory as a function of age in Down syndrome: A study using animal-based tasks. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29, 443–453.
- Nguyen, T., and Di Giovanni, S. (2008). NFAT signaling in neural development and axon growth. *Int. J. Dev. Neurosci.* 26, 141–145.
- Nguyen, T.L., Fruit, C., Héroult, Y., Meijer, L., and Besson, T. (2017). Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A) inhibitors: a survey of recent patent literature. *Expert Opin. Ther. Pat.* 0, 1–17.
- Oegema, R., Klein, A. de, Verkerk, A.J., Schot, R., Dumee, B., Douben, H., Eussen, B., Dubbel, L., Poddighe, P.J., Laar, I. van der, et al. (2010). Distinctive Phenotypic Abnormalities Associated with Submicroscopic 21q22 Deletion Including DYRK1A. *Mol. Syndromol.* 1, 113.
- Ogawa, T., and Hirokawa, N. (2015). Microtubule Destabilizer KIF2A Undergoes Distinct Site-Specific Phosphorylation Cascades that Differentially Affect Neuronal Morphogenesis. *Cell Rep.* 12, 1774–1788.

- Ogawa, Y., Nonaka, Y., Goto, T., Ohnishi, E., Hiramatsu, T., Kii, I., Yoshida, M., Ikura, T., Onogi, H., Shibuya, H., et al. (2010). Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A. *Nat. Commun.* *1*, ncomms1090.
- Oliver, B., and Buckley, S. (1994). The language development of children with Down syndrome: First words to two-word phrases. *Syndr. Res. Pract.* *2*, 71–75.
- Oliver, C., Crayton, L., Holland, A., and Bradbury, J. (1998). A four year prospective study of age-related cognitive change in adults with Down's syndrome. *Psychol. Med.*
- Olmos-Serrano, J.L., Tyler, W.A., Cabral, H.J., and Haydar, T.F. (2016). Longitudinal measures of cognition in the Ts65Dn mouse: Refining windows and defining modalities for therapeutic intervention in Down syndrome. *Exp. Neurol.* *279*, 40–56.
- 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*, 581–589.
- Ori-McKenney, K.M., McKenney, R.J., Huang, H.H., Li, T., Meltzer, S., Jan, L.Y., Vale, R.D., Wiita, A.P., and Jan, Y.N. (2016a). Phosphorylation of β -Tubulin by the Down Syndrome Kinase, Minibrain/DYRK1a, Regulates Microtubule Dynamics and Dendrite Morphogenesis. *Neuron* *90*, 551–563.
- Ori-McKenney, K.M., McKenney, R.J., Huang, H.H., Li, T., Meltzer, S., Jan, L.Y., Vale, R.D., Wiita, A.P., and Jan, Y.N. (2016b). Phosphorylation of β -Tubulin by the Down Syndrome Kinase, Minibrain/DYRK1a, Regulates Microtubule Dynamics and Dendrite Morphogenesis. *Neuron* *90*, 551.
- Park, J., Oh, Y., Yoo, L., Jung, M.-S., Song, W.-J., Lee, S.-H., Seo, H., and Chung, K.C. (2010). Dyrk1A Phosphorylates p53 and Inhibits Proliferation of Embryonic Neuronal Cells. *J. Biol. Chem.* *285*, 31895–31906.
- Park, J., Sung, J.Y., Park, J., Song, W.-J., Chang, S., and Chung, K.C. (2012). Dyrk1A negatively regulates the actin cytoskeleton through threonine phosphorylation of N-WASP. *J. Cell Sci* *125*, 67–80.
- Parker, S.E., Mai, C.T., Canfield, M.A., Rickard, R., Wang, Y., Meyer, R.E., Anderson, P., Mason, C.A., Collins, J.S., Kirby, R.S., et al. (2010). Updated national birth prevalence estimates for selected birth defects in the United States, 2004–2006. *Birt. Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* *88*, 1008–1016.
- 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.*
- Pons-Espinal, M., Martinez de Lagran, M., and Dierssen, M. (2013). Environmental enrichment rescues DYRK1A activity and hippocampal adult neurogenesis in TgDyrk1A. *Neurobiol. Dis.* *60*, 18–31.
- Prasher, V.P. (1995). Epilepsy and associated effects on adaptive behaviour in adults with Down syndrome. *Seizure* *4*, 53–56.

- Rachidi, M., and Lopes, C. (2008). Mental retardation and associated neurological dysfunctions in Down syndrome: A consequence of dysregulation in critical chromosome 21 genes and associated molecular pathways. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* *12*, 168–182.
- Rahmani, Z., Blouin, J.L., Creau-Goldberg, N., Watkins, P.C., Mattei, J.F., Poissonnier, M., Prieur, M., Chettouh, Z., Nicole, A., Aurias, A., et al. (1989). Critical role of the D21S55 region on chromosome 21 in the pathogenesis of Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 5958.
- Ravikumar, B., Duden, R., and Rubinsztein, D.C. (2002). Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 1107–1117.
- 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*, 177–184.
- Reinholdt, L.G., Ding, Y., Gilbert, G.T., Czechanski, A., Solzak, J.P., Roper, R.J., Johnson, M.T., Donahue, L.R., Lutz, C., and Davisson, M.T. (2011). Molecular characterization of the translocation breakpoints in the Down syndrome mouse model Ts65Dn. *Mamm. Genome* *22*, 685–691.
- Rizzoli, S.O. (2014). Synaptic vesicle recycling: steps and principles. *EMBO J.* *33*, 788–822.
- Roizen, N.J., and Amarose, A.P. (1993). Hematologic abnormalities in children with down syndrome. *Am. J. Med. Genet.* *46*, 510–512.
- Roizen, N.J., Wolters, C., Nicol, T., and Blondis, T.A. (1993). Hearing loss in children with Down syndrome. *J. Pediatr.* *123*, S9–S12.
- Roizen, N.J., Mets, M.B., and Blondis, T.A. (1994). OPHTHALMIC DISORDERS IN CHILDREN WITH DOWN SYNDROME. *Dev. Med. Amp Child Neurol.* *36*, 594–600.
- Ronan, A., Fagan, K., Christie, L., Conroy, J., Nowak, N.J., and Turner, G. (2009). Findings that shed new light on the possible pathogenesis of a disease or an adverse effect: Familial 4.3 Mb duplication of 21q22 sheds new light on the Down syndrome critical region. *BMJ Case Rep.* *2009*.
- Rondal, J., and Comblain, A. (1996). Language in adults with Down syndrome. *Syndr. Res. Pract.* *4*, 3–14.
- Roskoski, R. (2015). A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacol. Res.* *100*, 1–23.
- Rousseau, T., Amar, E., Ferdynus, C., Thauvin-Robinet, C., Gouyon, J.-B., and Sagot, P. (2010). Variations de prévalence de la trisomie 21 en population française entre 1978 et 2005. *J. Gynécologie Obstétrique Biol. Reprod.* *39*, 290–296.
- Rowe, J., Lavender, A., and Turk, V. (2006). Cognitive executive function in Down's syndrome. *Br. J. Clin. Psychol.* *45*, 5–17.

- Ryu, Y.S., Park, S.Y., Jung, M.-S., Yoon, S.-H., Kwen, M.-Y., Lee, S.-Y., Choi, S.-H., Radnaabazar, C., Kim, M.-K., Kim, H., et al. (2010). Dyrk1A-mediated phosphorylation of Presenilin 1: a functional link between Down syndrome and Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* *115*, 574–584.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 6256–6261.
- Salter, M.W., and Kalia, L.V. (2004). Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nat. Rev. Neurosci.* *5*, 317–328.
- Scales, T.M.E., Lin, S., Kraus, M., Goold, R.G., and Gordon-Weeks, P.R. (2009). Nonprimed and DYRK1A-primed GSK3 β -phosphorylation sites on MAP1B regulate microtubule dynamics in growing axons. *J Cell Sci* *122*, 2424–2435.
- Schmahmann, J.D., and Sherman, J.C. (1997). Cerebellar Cognitive Affective Syndrome. *Int. Rev. Neurobiol.* *41*, 433–440.
- Seifert, A., Allan, L.A., and Clarke, P.R. (2008). DYRK1A phosphorylates caspase 9 at an inhibitory site and is potently inhibited in human cells by harmine. *FEBS J.* *275*, 6268–6280.
- Shi, J., Zhang, T., Zhou, C., Chohan, M.O., Gu, X., Wegiel, J., Zhou, J., Hwang, Y.-W., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., et al. (2008). Increased Dosage of Dyrk1A Alters Alternative Splicing Factor (ASF)-regulated Alternative Splicing of Tau in Down Syndrome. *J. Biol. Chem.* *283*, 28660–28669.
- Shott, S.R., Joseph, A., and Heithaus, D. (2001). Hearing loss in children with Down syndrome. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* *61*, 199–205.
- Siarey, R.J., Villar, A.J., Epstein, C.J., and Galdzicki, Z. (2005). Abnormal synaptic plasticity in the Ts1Cje segmental trisomy 16 mouse model of Down syndrome. *Neuropharmacology* *49*, 122–128.
- Skurat, A.V., and Dietrich, A.D. (2004). Phosphorylation of Ser640 in Muscle Glycogen Synthase by DYRK Family Protein Kinases. *J. Biol. Chem.* *279*, 2490–2498.
- Smith, D.J., Zhu, Y., Zhang, J., Cheng, J.-F., and Rubin, E.M. (1995). Construction of a Panel of Transgenic Mice Containing a Contiguous 2-Mb Set of YAC/P1 Clones from Human Chromosome 21q22.2. *Genomics* *27*, 425–434.
- Smith, D.J., Stevens, M.E., Sudanagunta, S.P., Bronson, R.T., Makhinson, M., Watabe, A.M., O'Dell, T.J., Fung, J., Weier, H.-U.G., Cheng, J.-F., et al. (1997). Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates minibrain in learning defects associated with Down syndrome. *Nat. Genet.* *16*, 28–36.
- Soppa, U., Schumacher, J., Ortiz, V.F., Pasqualon, T., Tejedor, F., and Becker, W. (2014). The Down syndrome-related protein kinase DYRK1A phosphorylates p27Kip1 and Cyclin D1 and induces cell cycle exit and neuronal differentiation. *Cell Cycle*.

- Souchet, B., Guedj, F., Sahún, I., Duchon, A., Daubigney, F., Badel, A., Yanagawa, Y., Barallobre, M.J., Dierssen, M., Yu, E., et al. (2014). Excitation/inhibition balance and learning are modified by Dyrk1a gene dosage. *Neurobiol. Dis.* *69*, 65–75.
- Spruston, N. (2008). Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nat. Rev. Neurosci.* *9*, 206–221.
- Stagni, F., Giacomini, A., Emili, M., Trazzi, S., Guidi, S., Sassi, M., Ciani, E., Rimondini, R., and Bartesaghi, R. (2016). Short- and long-term effects of neonatal pharmacotherapy with epigallocatechin-3-gallate on hippocampal development in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Neuroscience* *333*, 277–301.
- Starbuck, J.M., Dutka, T., Ratliff, T.S., Reeves, R.H., and Richtsmeier, J.T. (2014). Overlapping trisomies for human chromosome 21 orthologs produce similar effects on skull and brain morphology of Dp(16)1Yey and Ts65Dn mice. *Am. J. Med. Genet. A.* *164*, 1981–1990.
- Stringer, M., Abeysekera, I., Dria, K.J., Roper, R.J., and Goodlett, C.R. (2015). Low dose EGCG treatment beginning in adolescence does not improve cognitive impairment in a Down syndrome mouse model. *Pharmacol. Biochem. Behav.* *138*, 70–79.
- Stringer, M., Abeysekera, I., Thomas, J., LaCombe, J., Stancombe, K., Stewart, R.J., Dria, K.J., Wallace, J.M., Goodlett, C.R., and Roper, R.J. (2017). Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) consumption in the Ts65Dn model of Down syndrome fails to improve behavioral deficits and is detrimental to skeletal phenotypes. *Physiol. Behav.* *177*, 230–241.
- Sureshbabu, R., Kumari, R., Ranugha, S., Sathyamoorthy, R., Udayashankar, C., and Oudeacoumar, P. (2011). Phenotypic and dermatological manifestations in Down Syndrome. *Dermatol. Online J.* *17*.
- Tahtouh, T., Elkins, J.M., Filippakopoulos, P., Soundararajan, M., Burgy, G., Durieu, E., Cochet, C., Schmid, R.S., Lo, D.C., Delhommel, F., et al. (2012). Selectivity, Cocrystal Structures, and Neuroprotective Properties of Leucettines, a Family of Protein Kinase Inhibitors Derived from the Marine Sponge Alkaloid Leucettamine B. *J Med Chem.* *2012*;55:9312–9330.
- Takashima, S., Iida, K., Mito, T., and Arima, M. (1994). Dendritic and histochemical development and ageing in patients with Down's syndrome. *J. Intellect. Disabil. Res.* *38*, 265–273.
- Tatyana Adayev, ‡, Mo-Chou Chen-Hwang, ‡, Noriko Murakami, ‡, Jerzy Wegiel, § and, and Yu-Wen Hwang*, ‡ (2006). Kinetic Properties of a MNB/DYRK1A Mutant Suitable for the Elucidation of Biochemical Pathways†.
- Tejedor, F., Zhu, X.R., Kaltenbach, E., Ackermann, A., Baumann, A., Canal, I., Heisenberg, M., Fischbach, K.F., and Pongs, O. (1995). minibrain: A new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in *Drosophila*. *Neuron* *14*, 287–301.
- Thomas, K., Bourke, J., Girdler, S., Bebbington, A., Jacoby, P., and Leonard, H. (2011). Variation Over Time in Medical Conditions and Health Service Utilization of Children with Down Syndrome. *J. Pediatr.* *158*, 194–200.e1.

Thomazeau, A., Lassalle, O., Iafrati, J., Souchet, B., Guedj, F., Janel, N., Chavis, P., Delabar, J., and Manzoni, O.J. (2014). Prefrontal Deficits in a Murine Model Overexpressing the Down Syndrome Candidate Gene *Dyrk1a*. *J. Neurosci.* *34*, 1138–1147.

Torre, R., Sola, S., Pons, M., Duchon, A., Lagran, M.M., Farré, M., Fitó, M., Benejam, B., Langohr, K., Rodriguez, J., et al. (2014a). Epigallocatechin-3-gallate, a DYRK1A inhibitor, rescues cognitive deficits in Down syndrome mouse models and in humans. *Mol. Nutr. Amp Food Res.* *58*, 278–288.

Torre, R., Sola, S., Pons, M., Duchon, A., Lagran, M.M., Farré, M., Fitó, M., Benejam, B., Langohr, K., Rodriguez, J., et al. (2014b). Epigallocatechin-3-gallate, a DYRK1A inhibitor, rescues cognitive deficits in Down syndrome mouse models and in humans. *Mol. Nutr. Amp Food Res.* *58*, 278–288.

Torre, R. de la, Sola, S. de, Hernandez, G., Farré, M., Pujol, J., Rodriguez, J., Espadaler, J.M., Langohr, K., Cuenca-Royo, A., Principe, A., et al. (2016). Safety and efficacy of cognitive training plus epigallocatechin-3-gallate in young adults with Down's syndrome (TESDAD): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol.* *15*, 801–810.

Tsao, R., and Mellier, D. (2005). Étude des habiletés graphomotrices chez l'enfant et l'adulte porteurs de trisomie 21 : approche développementale et comparative. *Neuropsychiatr. Enfance Adolesc.* *53*, 401–406.

Valetto, A., Orsini, A., Bertini, V., Toschi, B., Bonuccelli, A., Simi, F., Sammartino, I., Taddeucci, G., Simi, P., and Saggese, G. (2012). Molecular cytogenetic characterization of an interstitial deletion of chromosome 21 (21q22.13q22.3) in a patient with dysmorphic features, intellectual disability and severe generalized epilepsy. *Eur. J. Med. Genet.* *55*, 362–366.

Vicari, S. (2006). Motor Development and Neuropsychological Patterns in Persons with Down Syndrome. *Behav. Genet.* *36*, 355–364.

Vicari, S., Caselli, M.C., and Tonucci, F. (2000). Asynchrony of lexical and morphosyntactic development in children with Down Syndrome. *Neuropsychologia* *38*, 634–644.

Vicari, S., Bates, E., Caselli, M.C., Pasqualetti, P., Gagliardi, C., Tonucci, F., and Volterra, V. (2004). Neuropsychological profile of Italians with Williams syndrome: An example of a dissociation between language and cognition?

Waites, C.L., Leal-Ortiz, S.A., Andlauer, T.F.M., Sigrist, S.J., and Garner, C.C. (2011). Piccolo regulates the dynamic assembly of presynaptic F-actin. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 14250.

Walte, A., Rüben, K., Birner-Gruenberger, R., Preisinger, C., Bamberg-Lemper, S., Hilz, N., Bracher, F., and Becker, W. (2013). Mechanism of dual specificity kinase activity of DYRK1A. *FEBS J.* *280*, 4495–4511.

Wegiel, J., Kuchna, I., Nowicki, K., Frackowiak, J., Dowjat, K., Silverman, W.P., Reisberg, B., deLeon, M., Wisniewski, T., Adayev, T., et al. (2004). Cell type- and brain structure-specific patterns of distribution of minibrain kinase in human brain. *Brain Res.* *1010*, 69–80.

Wegiel, J., Gong, C.-X., and Hwang, Y.-W. (2011). The role of DYRK1A in neurodegenerative diseases. *FEBS J.* *278*, 236–245.

- Wilson, R.I., and Nicoll, R.A. (2002a). Endocannabinoid Signaling in the Brain. *Science* 296, 678–682.
- Wilson, R.I., and Nicoll, R.A. (2002b). Endocannabinoid Signaling in the Brain. *Science* 296, 678–682.
- Wisniewski, K.E. (1990). Down syndrome children often have brain with maturation delay, retardation of growth, and cortical dysgenesis. *Am. J. Med. Genet. A.* 37, 274–281.
- Witter, M.P., and Amaral, D.G. (1991). Entorhinal cortex of the monkey: V. Projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex. *J. Comp. Neurol.* 307, 437–459.
- Woods, Y.L., Rena, G., Morrice, N., Barthel, A., Becker, W., Guo, S., Unterman, T.G., and Cohen, P. (2001a). The kinase DYRK1A phosphorylates the transcription factor FKHR at Ser329 in vitro, a novel in vivo phosphorylation site. *Biochem. J.* 355, 597–607.
- Woods, Y.L., Cohen, P., Becker, W., Jakes, R., Goedert, M., Wang, X., and Proud, C.G. (2001b). The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2B ϵ at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212: potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase. *Biochem. J.* 355, 609–615.
- Woods, Y.L., Rena, G., Morrice, N., Barthel, A., Becker, W., Guo, S., Unterman, T.G., and Cohen, P. (2001c). The kinase DYRK1A phosphorylates the transcription factor FKHR at Ser329 in vitro, a novel in vivo phosphorylation site. *Biochem. J.* 355, 597.
- Wu, P., Nielsen, T.E., and Clausen, M.H. (2015). FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends Pharmacol. Sci.* 36, 422–439.
- Wu, P., Nielsen, T.E., and Clausen, M.H. (2016). Small-molecule kinase inhibitors: an analysis of FDA-approved drugs. *Drug Discov. Today* 21, 5–10.
- Yabut, O., Domogauer, J., and D’Arcangelo, G. (2010). Dyrk1A Overexpression Inhibits Proliferation and Induces Premature Neuronal Differentiation of Neural Progenitor Cells. *J. Neurosci.* 30, 4004–4014.
- Yamamoto, T., Shimojima, K., Nishizawa, T., Matsuo, M., Ito, M., and Imai, K. (2011). Clinical manifestations of the deletion of Down syndrome critical region including DYRK1A and KCNJ6. *Am. J. Med. Genet. A.* 155, 113–119.
- Yang, C.S., Wang, X., Lu, G., and Picinich, S.C. (2009). Cancer prevention by tea: animal studies, molecular mechanisms and human relevance. *Nat. Rev. Cancer* 9, 429–439.
- Yang, Q., Rasmussen, S.A., and Friedman, J. (2002). Mortality associated with Down’s syndrome in the USA from 1983 to 1997: a population-based study. *The Lancet* 359, 1019–1025.
- Yu, W., and Krook-Magnuson, E. (2015). Cognitive Collaborations: Bidirectional Functional Connectivity Between the Cerebellum and the Hippocampus. *Front. Syst. Neurosci.* 9.
- Yu, T., Liu, C., Belichenko, P., Clapcote, S.J., Li, S., Pao, A., Kleschevnikov, A., Bechard, A.R., Asrar, S., Chen, R., et al. (2010). Effects of individual segmental trisomies of human

chromosome 21 syntenic regions on hippocampal long-term potentiation and cognitive behaviors in mice. *Brain Res.* 1366, 162–171.

Yu Huang, ‡, Mo-Chou Chen-Hwang, ‡, Georgia Dolios, †, Noriko Murakami, ‡, Júlio C. Padovan, †, Rong Wang, † and, and Yu-Wen Hwang*, ‡ (2004). Mnb/Dyrk1A Phosphorylation Regulates the Interaction of Dynamin 1 with SH3 Domain-Containing Proteins†.

Zachor, D.A., Mroczek-musulman, E., and Brown, P. Prevalence of celiac disease in Down syndrome in the United States. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 31, 275–279.

Zou, Y., Lim, S., Lee, K., Deng, X., and Friedman, E. (2003). Serine/Threonine Kinase Mirk/Dyrk1B Is an Inhibitor of Epithelial Cell Migration and Is Negatively Regulated by the Met Adaptor Ran-binding Protein M. *J. Biol. Chem.* 278, 49573–49581.