



HAL
open science

Validation d'inhibiteurs de la kinase DYRK1A optimisés pour améliorer les capacités cognitives sur des modèles rongeurs du syndrome de Down

Helin Atas-Özcan

► **To cite this version:**

Helin Atas-Özcan. Validation d'inhibiteurs de la kinase DYRK1A optimisés pour améliorer les capacités cognitives sur des modèles rongeurs du syndrome de Down. Neurosciences. Université de Strasbourg, 2022. Français. NNT : 2022STRAJ120 . tel-04813438

HAL Id: tel-04813438

<https://theses.hal.science/tel-04813438v1>

Submitted on 2 Dec 2024

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.

ÉCOLE DOCTORALE Sciences de la Vie et de la Santé (ED414)
Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC)

THÈSE présentée par :

Helin ATAS-ÖZCAN

Soutenue le : 13 Décembre 2022

En vue de l'obtention du grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/Spécialité : Neurosciences

**Validation d'inhibiteurs de la kinase DYRK1A optimisés
pour améliorer les capacités cognitives
sur des modèles rongeurs du syndrome de Down**

THÈSE dirigée par :

Yann HERAULT

Directeur de Recherche, CNRS, Strasbourg

Véronique BRAULT

Chargée de Recherche, CNRS, Strasbourg

RAPPORTEURS :

Frédéric LAUMONNIER

Chargé de Recherche, INSERM, Tours

Marie-Claude POTIER

Directrice de Recherche, CNRS, Paris

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Nathalie JANEL

Professeur Universitaire, Université Paris Cité, Paris

Hervé MOINE

Directeur de Recherche, CNRS, Strasbourg

*« Chacun de nous doit travailler pour son propre perfectionnement
et en même temps partager une responsabilité générale pour toute l'humanité. »*

Marie Curie

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement les membres de mon jury, le Dr. Marie-Claude Potier, le Dr. Frédéric Laumonnier, le Dr. Nathalie Janel, ainsi que le Dr. Hervé Moine, qui m'ont fait l'honneur d'accepter et pris le temps d'évaluer mon travail de thèse. Je souhaite également remercier le Dr. Amélie Piton et à nouveau le Dr. Marie-Claude Potier pour avoir suivi l'évolution de mes travaux au cours de mes comités de suivi de thèse. Merci pour vos conseils et votre bienveillance.

Ma profonde reconnaissance va envers mon directeur de thèse, le Dr. Yann Hérault. Merci de m'avoir donné l'opportunité d'intégrer votre équipe et de m'avoir fait confiance pendant ces quatre années. Merci pour votre patience et pour les connaissances que vous m'avez transmises au cours de ces dernières années. J'ai eu la chance d'apprendre beaucoup à vos côtés.

Un grand merci à ma co-directrice de thèse, le Dr. Véronique Brault. Merci de m'avoir soutenue au niveau scientifique mais aussi au niveau personnel. Merci d'avoir toujours été à l'écoute, toujours de bon conseil. Ton aide et ta gentillesse m'ont été précieuses. Et enfin, merci pour la relecture de ce manuscrit et pour tous tes commentaires sans lesquels ce manuscrit ne serait pas ce qu'il est.

Je voudrais remercier particulièrement le Dr. Laurent Meijer qui a été bien plus qu'un producteur de Leucettinib ! Merci à toi, mon mentor, merci de m'avoir épaulée pendant ces quatre années. Je garderai toujours le souvenir « d'un grand homme ». Merci pour ta bienveillance, ta compréhension, ton humanité. J'ai été honoré de te rencontrer. Merci de m'avoir donné l'opportunité de découvrir Perha Pharmaceuticals. Je n'oublierai pas notre séjour à Long Beach, nos agréables discussions et repas.

Je souhaite ensuite remercier toutes les personnes de l'équipe que j'ai côtoyées au quotidien durant ces 4 années. Merci à Michel pour ses discussions toujours enrichissantes et ses questions pertinentes. Merci à Vicky pour ses conseils scientifiques et sa bonne humeur. Merci pour ton aide sur la culture cellulaire ainsi que pour le *pull-down*. Merci à Claire d'être toujours débordante de joie et de m'avoir appris à gérer les lignées souris. Merci d'avoir toujours su répondre à mes questions pour la rédaction des saisines. Merci également à Élodie, j'aurai voulu te connaître un peu mieux et passer plus de temps avec toi. Je te remercie d'avoir été présente et à l'écoute pendant un des moments les plus difficiles de ma thèse. Merci aussi à Marie-Christine, Valérie et Monika pour votre bonne humeur. Je tiens aussi à remercier mon binôme de box, merci à toi Arnaud pour ta gentillesse, ta façon de toujours prendre les choses à la légère et tes nombreuses aides au quotidien. Tu as su me supporter moi et toutes mes

petites questions pendant ces quatre ans. Merci pour nos petites discussions et nos goûters avec toujours plus de chocolat noir, notre péché mignon (la découverte du KitKat chocolat noir). Je tiens aussi à remercier tous les étudiants de l'équipe, anciens comme nouveaux. Merci à Yaping, Céleste, Ameer, Mar, Marion, Thomas, Alexandra, Pauline et Sandra. Je vous remercie pour tous les moments passés, que ce soit au labo ou en dehors, vous avez été une équipe formidable !

Un grand merci à tout l'ICS. Merci à Dalila, Sophie et Charley d'avoir pris soin de mes souris en zone d'élevage. Merci d'avoir pris le temps pour les croisements difficiles des souris Dp1Yey. Un grand merci à Géraldine, sans toi et ton expertise je n'aurais pas eu mes cohortes de rats. Merci également pour nos nombreuses discussions et pour ta gentillesse. Merci aussi à Sandrine d'avoir aussi pris soin de mes rats en zone d'élevage. Il m'est impossible d'oublier Hamid, Chaouki et Mourad. Merci d'avoir pris soins de mes rats ainsi que de mes souris quand je ne le pouvais pas. Merci en particulier à Chaouki d'avoir toujours répondu à mes questions. Merci à Fabrice et Christophe pour leurs expertises comportementales et l'apprentissage du gavage oral. Merci aussi aux animaliers de la zone phéno de l'IGBMC. Je souhaite aussi remercier Isabelle, notre vétérinaire exceptionnelle. Merci pour ta disponibilité, ton aide et tes nombreux conseils concernant nos amis les rongeurs.

Merci à toute l'équipe de Perha Pharmaceuticals pour la synthèse des Leceuttinibs qui étaient le centre de mon projet de thèse. Je tiens à remercier particulièrement le Dr. Mattias Lindberg pour sa sympathie et ses discussions agréables. Long Beach n'aurait pas été pareil sans toi et Laurent.

Merci au Dr. Julien Dairou pour la réalisation des dosages d'activité kinase. Merci au Dr. Luc Negroni et à l'ensemble de la plateforme de Protéomique de l'IGBMC pour les analyses de spectrométrie de masse. Merci aussi à toute l'équipe de GenomEast de transcriptomique.

Je tiens également à remercier toute l'équipe du midi du troisième étage. Merci à Sirine, Jérémie, Ekat, Karima, Laure, Oktay, Pierre et tous les autres. Merci pour les repas partagés ainsi que pour nos discussions.

Je souhaite aussi remercier la Fondation Jérôme Lejeune qui a financé ma quatrième année de thèse, me permettant ainsi de finaliser mes études de traitement sur les modèles rats.

Je tiens à remercier mes amies adorées : Claire, Eda, Eliz, Anaïs et Emine. Je vous ai toutes quelques peu délaissées ces dernières années (à part ma chère Claire qui est toujours à domicile). Je vous remercie de votre patience et de votre compréhension. Vos attentions et encouragements m'ont accompagné tout au long de ces années et promis, vous retrouverez

bientôt votre Kuzu ! Je tiens à remercier tout particulièrement ma Princesse. Merci de m'avoir épaulée et soutenue au cours de ces dernières années et surtout vers la fin ! Ta bonne humeur et ta positive attitude sont de vrais rayons de soleil. Je te remercie énormément pour ton aide, ta patience et ta disponibilité pour la finalisation de ce manuscrit. Sans toi, ce manuscrit ne serait pas ce qu'il est. DYRK1A n'a plus de secret pour toi ☺

Enfin, je tiens à remercier ceux qui me sont chers, ma moitié, ma famille. Merci à toute la famille Atas ! Merci à Abi, Abla, Yenge, Alev, Dayi, Sezer, Ziwan, Roj et surtout il ne faut pas oublier les petits derniers (M. R. et L. <3). Un grand merci pour le soutien de l'équipe Guvenç ! Je vous remercie pour votre compréhension et votre patience au cours de ces dernières années. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir toujours soutenue. Je tiens à remercier particulièrement mon adorée Abla. Merci de m'avoir aidé pour la rédaction en anglais, merci du temps que tu as consacré pour m'aider, m'épauler et me remotiver : « étape par étape Helin ! ». Je tiens aussi à remercier mon cher Muss. Merci pour ta patience et ta compréhension pendant ces derniers mois. Merci d'être toujours présent et de toujours me soutenir, même quand je devenais insupportable. Merci aussi à ma belle *Schweppes*.

Et enfin, mes parents. À vous, à qui je dois tout, tout ce que je suis et tout ce que je fais. Sans tous vos sacrifices cette thèse n'aurait pas eu lieu. Vous m'avez toujours soutenue et poussé pour que j'aie encore plus loin. Anne, merci pour ta tendresse et surtout pour ta force de caractère. Merci pour toute ton aide et tes encouragements. Merci d'être toujours présente pour ta petite dernière. Baba, merci de m'avoir transmis ta rigueur du travail et ta discipline. Merci d'avoir consacré ta vie au bonheur de ta famille. Je ne pourrais jamais suffisamment vous remercier. Tout ce que je peux faire c'est de vous dédier cette thèse. Cette thèse, elle est pour vous, car sans vous, elle n'existerait pas.

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS.....	1
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLES	13

INTRODUCTION **15**

CHAPITRE 1 : LE SYNDROME DE DOWN	17
I. Du « crétinisme » au syndrome de Down.....	17
II. Épidémiologie du syndrome de Down	18
1. Prévalence	18
2. Facteurs de risques	19
2.1. Âge maternel avancé.....	19
2.2. Environnement	21
III. Origine génétique du syndrome de Down.....	22
1. Les différentes formes.....	22
1.1 Trisomie libre	22
1.2 Trisomie mosaïque.....	22
1.3 Trisomie transloquée.....	22
2. Origine génétique	23
2.1 Non-ségrégation au cours de la méiose.....	23
2.2 Non-ségrégation au cours de la mitose.....	24
IV. Signes cliniques et cognition du syndrome de Down	24
1. Dismorphies physiques.....	24
2. Déficience intellectuelle.....	26
2.1 Quotient intellectuel.....	27
2.2 Fonctions exécutives et attention	27
2.3 Mémoire à long terme.....	28
3. Hypotonie musculaire	29
4. Comorbidités associées au syndrome de Down	29
4.1 Malformations cardiaques.....	30
4.2 Pathologies pulmonaires	30
4.3 Troubles de l'audition et de la vision.....	31
4.4 Troubles du sommeil	31
4.5 Anomalies gastro-intestinales	32
4.6 Cancer	32
4.7 Maladie d'Alzheimer	32
V. Anomalies cérébrales	33
1. Atteintes de la structure et de la fonctionnalité cérébrale.....	33
2. Atteintes au niveau cellulaire.....	35
3. Atteintes de la plasticité synaptique.....	36
VI. Corrélation génotype-phénotype dans les trisomies 21 dues à des duplications segmentaires	37
VII. Modèles rongeurs du syndrome de Down	39
1. Les modèles souris	39
1.1 Le modèle Ts65Dn	40
1.2 Le modèle Tc1	42
1.3 Le modèle souris Dp1Yey.....	43
2. Les modèles rats.....	43
2.1 Le modèle de rat trans-chromosomique.....	44
2.2 Modèles rats générés avec la technologie CRISMERE	44
CHAPITRE 2 : DYRK1A, UNE CIBLE THERAPEUTIQUE.....	49
I. Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A : DYRK1A	49
1. Le gène DYRK1A.....	49
2. La protéine DYRK1A.....	49
2.1 Structure	50
2.2 Expression	52

2.3	Activation	53
II.	Phénotypes associés au dosage du gène <i>Dyrk1a</i>	54
III.	De la fonction génique de <i>Dyrk1a</i> dans le développement et la physiologie, à la correction de sa dose tout au long de la vie dans le syndrome de Down	57
PROJETS.....		89

MATERIELS ET METHODES

91

PROJET I : VALIDATION ET MODELISATION D'UN NOUVEAU MODELE RAT SUREXPRESSANT LE GENE DYRK1A.....	93
PROJET II : VALIDATION D'INHIBITEURS DE LA KINASE DYRK1A OPTIMISES POUR AMELIORER LES CAPACITES COGNITIVES SUR DES MODELES RONGEURS DU SYNDROME DE DOWN	95
I. Animaux.....	95
1. Modèles animaux.....	95
2. Condition d'hébergement.....	96
3. Autorisation de projet.....	97
II. Génotypage	97
1. Génotypage des modèles souris	97
1.1 Digestion tissulaire pour l'extraction d'ADN	97
1.1.1. Digestion tissulaire avec l'hydroxyde de sodium (NaOH)	98
1.1.2. Digestion tissulaire par Direct PCR.....	98
1.2 Amplification de l'ADN.....	98
1.2.1. Amplification par la technique de PCR pour la lignée de souris Tg(<i>Dyrk1a</i>).....	98
1.2.2. Amplification par la technique de PCR pour la lignée souris Dp1Yey	99
1.3 Migration par électrophorèse sur gel d'agarose.....	101
2. Génotypage des modèles rats.....	101
2.1 Extraction d'ADN pour la ddPCR.....	101
2.2 Protocole de la ddPCR.....	102
2.3 Génotypage de la duplication du Rno11 et du nombre de copies d'APP ^H	103
2.4 Génotypage de la duplication du Rno20	103
III. Traitements aux Leucettinibs.....	104
1. Description et préparation des traitements	104
2. Administration du traitement	105
3. Chronologie des études des inhibiteurs de DYRK1A sur les modèles rongeurs du SD.....	108
3.1 Étude des Leucettinibs sur les modèles souris du SD	108
3.1.1. Étude de l'EMD10 sur le modèle Tg(<i>Dyrk1a</i>) pendant 19 jours de traitement.....	108
3.1.2. Étude de l'EMD10 sur le modèle Tg(<i>Dyrk1a</i>) pendant 10 jours de traitement.....	109
3.1.3. Étude de l'EMD92 sur le modèle Tg(<i>Dyrk1a</i>) pendant 10 jours de traitement.....	110
3.1.4. Étude de l'EMD92 sur le modèle Dp1Yey pendant 11 jours de traitement	111
3.1.5. Étude de l'EMD173 sur le modèle Dp1Yey pendant 11 jours de traitement	112
3.2 Étude de l'EMD173 sur les modèles rats du SD	113
IV. Tests comportementaux	115
1. Phase d'habituation à l'expérimentateur.....	115
2. Analyse comportementale chez les modèles souris du syndrome Down.....	115
2.1 Labyrinthe en Y	115
2.2 Test du champ ouvert	116
2.3 Test de reconnaissance de la position d'un objet.....	117
2.4 Test de reconnaissance du nouvel objet.....	118
3. Analyse comportementale chez les modèles rats du syndrome de Down : le test de la piscine de Morris...	120
3.1 Dispositif de la piscine de Morris.....	120
3.2 Protocole de la piscine de Morris	121
V. Imagerie cérébrale	123
1. Principe de l'IRMf	123
2. Dispositif	123
3. Anesthésie des animaux.....	124
4. Acquisition des images cérébrales.....	124
5. Traitement des images.....	125
VI. Mise à mort des animaux et prélèvements	126
1. Mise à mort des souris	126
2. Mise à mort des rats.....	127

VII.	Analyse statistique.....	128
VIII.	Biologie Moléculaire.....	128
1.	Extraction de protéines.....	128
1.1	Méthode d'extraction de protéine pour la réalisation de western blot.....	128
1.2	Méthode d'extraction de protéine pour le dosage de l'activité de DYRK1A.....	129
2.	Dosage des protéines.....	129
3.	Western blot.....	130
4.	Dosage de l'activité catalytique de DYRK1A par HPLC.....	131
4.1	Principe de l'HPLC.....	131
4.2	Le FAM-peptide.....	132
4.3	Protocole de dosage.....	132
5.	Analyse du profil d'activité du kinome.....	133
PROJET III : IDENTIFICATION DE POTENTIELS NOUVEAUX INTERACTEURS DE DYRK1A : OPTIMISATION D'UNE METHODE D'ANALYSE D'INTERACTION PROTEINE-PROTEINE.....		
		135
I.	Animaux.....	135
1.	Le modèle <i>Dyrk1a</i> -OST.....	135
2.	Hébergement des animaux.....	136
II.	Génotypage de la lignée <i>Dyrk1a</i> -OST.....	137
1.	Digestion tissulaire pour l'extraction d'ADN.....	137
2.	Amplification par la technique de PCR.....	137
3.	Migration par électrophorèse sur gel d'agarose.....	138
III.	Biologie moléculaire.....	139
1.	Extraction de protéines.....	139
2.	Chromatographie d'affinité sur colonne.....	140
2.1	Principe.....	140
2.2	Protocole.....	140
3.	Dosage de protéines.....	141
4.	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	142
5.	Coloration d'argent des protéines sur gel SDS-PAGE.....	142
6.	Western Blot.....	143
7.	Spectrométrie de masse.....	144

RESULTATS

145

PROJET I : VALIDATION ET CARACTERISATION D'UN NOUVEAU MODELE TRISOMIQUE POUR LE GENE <i>DYRK1A</i>		147
PROJET II : ÉTUDE DE NOUVEAUX INHIBITEURS DE LA KINASE DYRK1A SUR DES MODELES DE RONGEURS DU SYNDROME DE DOWN.....		179
I.	Étude de l'EMD10 sur le modèle Tg(<i>Dyrk1a</i>) pendant 19 jours de traitement.....	181
1.	Effet de l'EMD10 pendant 19 jours de traitement sur les capacités mnésiques des souris Tg(<i>Dyrk1a</i>).....	182
1.1	Activité locomotrice et habitude à l'arène des souris.....	182
1.2	Mémoire de reconnaissance de la position de l'objet.....	184
1.3	Mémoire de reconnaissance d'objet.....	186
2.	Effet de l'EMD10 pendant 19 jours de traitements sur l'activité kinase de DYRK1A chez les souris Tg(<i>Dyrk1a</i>).....	188
2.1	Activité kinase de DYRK1A.....	189
2.2	Phosphorylation de TAU, une cible de DYRK1A.....	190
2.3	Profil d'activité du kinome.....	191
II.	Étude de l'EMD10 sur le modèle Tg(<i>Dyrk1a</i>) pendant 10 jours de traitements.....	202
1.	Effet de l'EMD10 sur les capacités mnésiques des souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) pendant 10 jours de traitements.....	202
1.1	Activité locomotrice et habitude à l'arène des souris.....	203
1.2	Mémoire de reconnaissance de position.....	204
1.3	Mémoire de reconnaissance d'objet.....	206
III.	Étude de l'EMD92 sur le modèle Tg(<i>Dyrk1a</i>) pendant 10 jours de traitements.....	208
1.	Effet de l'EMD92 sur les fonctions mnésiques des souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) pendant 10 jours de traitement.....	208
1.1	Labyrinthe en Y.....	209
1.2	Activité locomotrice et habitude à l'arène des souris.....	210
1.3	Mémoire de reconnaissance de position.....	211
1.4	Mémoire de reconnaissance d'objet.....	212
IV.	Étude de l'EMD92 sur le modèle Dp1Yey pendant 11 jours de traitements.....	214

1.	Effet de l'EMD92 sur les fonctions mnésiques des souris Dp1Yey pendant 11 jours de traitement	215
1.1	Labyrinthe en Y	215
1.2	Activité locomotrice et habitude à l'arène des souris	216
1.3	Mémoire de reconnaissance de position	218
1.4	Mémoire de reconnaissance d'objet.....	219
2.	Impact de l'EMD92 sur l'activité cérébrale des souris Dp1Yey après 11 jours de traitements.....	220
3.	Impact de l'EMD92 sur l'activité kinase de DYRK1A chez les souris Dp1Yey.....	224
V.	Étude de l'EMD173 sur le modèle Dp1Yey pendant 11 jours de traitements	225
1.	Effet de l'EMD173 sur les fonctions mnésiques des souris Dp1Yey pendant 11 jours de traitement.....	225
1.1	Activité locomotrice et habitude à l'arène des souris	226
1.2	Mémoire de reconnaissance d'objet.....	228
2.	Impact de l'EMD173 sur l'activité kinase de DYRK1A chez les souris Dp1Yey.....	229
2.1	Activité catalytique de DYRK1A	229
2.2	Profil d'activité du kinome.....	230
VI.	Étude de l'EMD173 sur les modèles rats du SD pendant 12 à 13 jours de traitements.....	235
1.	Effet de l'EMD173 sur les fonctions mnésiques des modèles rats du SD	236
1.1	Phase d'acquisition	236
1.2	Phase de rappel.....	239
2.	Impact de l'EMD173 sur l'activité kinase de DYRK1A dans les modèles rats du SD.....	242
VII.	Conclusion générale des résultats de l'étude de nouveaux inhibiteurs de DYRK1A sur les modèles rongeurs du SD.....	243
	PROJET III : IDENTIFICATION DE POTENTIELS NOUVEAUX INTERACTEURS DE DYRK1A	247
	I. Optimisation de la technique du <i>pull-down</i>	247
	II. Identification de potentiels nouveaux interacteurs de DYRK1A	252
	DISCUSSION	259
	PROJET I : NOUVEAUX MODELES RATS PRESENTANT UNE HAPLOINSUFFISANCE ET UNE TRISOMIE DU GENE DYRK1A POUR L'ETUDE DES SYNDROMES DE MRD7 ET DE DOWN.	261
	PROJET II : ÉTUDE DE NOUVEAUX INHIBITEURS DE LA KINASE DYRK1A SUR DES MODELES DE RONGEURS DU SYNDROME DE DOWN	269
	PROJET III : IDENTIFICATION DE POTENTIELS PARTENAIRES PROTEIQUES DE DYRK1A CHEZ LE MODELE SOURIS.....	283
	CONCLUSION	285
	REFERENCES	289

Liste des Abréviations

21p = Bras court du chromosome 21
21q = Bras long du chromosome 21
A β = Peptide b-Amyloïde
ABC1 = Activity of Bc1 Complexe Kinase
Abcg1 = ATP Binding Cassette Subfamily G Member 1
AD = Alzheimer's Disease = Maladie d'Alzheimer
ADN ou DNA = Acide Désoxyribonucléique
AGC = Kinase des familles A, G et C
ALGERNON = Altered Generation of Neurons
AMPA = Acide α -Amino-3-hydroxy-5-Méthyl-4-Propionique
ANTs = Advanced Normalization Tools
APC = Principal Component Analysis
APP = β -Amyloid Precurseur Protein = Protéine précurseur de l'amyloïde
APP^H = APP Humanisé
ASK1 = Apoptotic signal-regulating Kinase 1
ATP = Adénosine triphosphate
B-RAF = Rapidly Accelerated Fibrosarcoma B Kinase
BAC = Chromosome Artificiel de Bactérie
BET = Bromure d'éthidium
BINDY = Benzofuro-fused INDY
BioGRID = Biological General Repository for Interaction Datasets
BOLD = Blood Oxygen Level Dependant
BSA = Albumine de Sérum
CALB1 = Calbindin 1
CAMK = Kinase Ca²⁺/Calmoduline Dépendante
CaNDY = CDC37 association inhibitor for DYRK1A
CBR1 = Carbonyl Reductase 1
CDK = Cyclin-Dependant Kinase
CK1 = Casein Kinase 1
CLK = Cdc2-like Kinases
CMC = Carboxyméthylcellulose
CMGC = Famille de Kinases comportant les CDK, MAPK, GSK et les CLK
CNS = Central Nervous System = Système Nerveux Central
CO₂ = Dioxyde de Carbone
CRISMERE = CRISPR Mediated Rearrangement
DBS = Double-Strand Breaks
DCR = Down Syndrome Chromosomal Region = Région chromosomique du syndrome de Down
ddPCR = Droplet Digital PCR

DEG = Differential Expressed Genes
DG = Dentate Gyrus
DH = DYRK Homology-box
Do = Objet Déplacé
Dp1Yey = Dp(16)1Yey = Dp(16*Lipi-Zbtb21*)1Yey
Dpc = Days Postcoitum
DSCAM = Down Syndrome Cell Adhesion Molecule
Dscr3 = Down Syndrome Critical Region 3
DSCR4 = Down Syndrome Critical Region 4
DTI = IRM du tenseur de diffusion
DYRK = Dual-specificity Tyrosine-Phosphorylated Kinase
DYRK1A = Dual-specificity Tyrosine-Phosphorylated Kinase 1A
Dyrk1a-OST = *Dyrk1a*-One-Strep-TAG
E = Est
EGFP = Enhanced Green Fluorescent Protein
EGCG = Gallate d'épigallocatechine
ERK = Extracellular signal-Regulated Kinases
ERG = E-26 transformation-specific Related Gene
Ex16 = Exon 16
Ex17 = Exon 17
FA = Fractional Anisotropy
FAM = Carboxyfluorescein
F-DANDY = Fluoro derivatives of 3,5-di(polyhydroxyaryl)-7-azaindoles
FC = Fold-Change
FCROS = Fold-Change Rank-Ordering Statistics
FDR = False discovery rate correction
FINDY = Floding Intermediate-selective Inhibition of DYRK1A
Fo = Objet Familier
FOV = Champ de vue
GABA = Acide γ -aminobutyrique
GDI1 = Rab GDP dissociation inhibitor alpha
GE-EPI = écho de gradient
Glo1 = Glyoxalase I
GMGC = Famille de Kinases comprenant les CDK, les MAPK, les GSK et les CLK
GSK = Glycogen Synthase Kinases
GTE = Green Tea Extract
GTP = Guanosine Triphosphate
h = Heure
HD = Huntington's Disease
HEX = Hexachlorofluorescein
HEK293 = Human Embryonic Kidney 293

HIP1 = Huntingtin Interacting Protein 1
HIPK = Homeodomain Interacting Protein Kinases
His = Séquence poly-Histidine
HPLC = High Performance Liquid Chromatography
HR-DSCR = Highly Restricted Down Syndrome Critical Region
HRP = Peroxydase de raifort
Hsa21 = Chromosome 21 Humain (*Homo Sapiens*)
IC50 = Concentration Inhibitrice Médiane
iCUBE = Laboratoire des Sciences de l'Ingénieur, de l'Informatique et de l'Imagerie
ICS = Institut Clinique de la Souris
IGBMC = Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
INDY = Inhibiteur de DYRK1A
IRMf = Imagerie par Résonance Magnétique Fonctionnelle
kb = Kilobases
KCNJ6 = Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 6
KCNJ15 = Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 15
Ki-67 = Marqueur des cellules en phases G1, S, G2 et M du cycle cellulaire
L41 = Leucettine 41
LB = Lewi Bodies
Lipi = Lipase I
LTCB21 = Leucettinb-21
LTD = Dépression à Long Terme
LTP = Potentialisation à Long Terme
MAC1 = Mouse Artificial Chromosome 1
MAO-A = Monoamine Oxidase-A
MAP = Microtubule-Associated Proteins
MAPK = Mitogen-Activated Protein Kinases
MAPT = Microtubule Associated Protein Tau
Mb = Mégabases
mEPSCs = Miniature Excitatory PostSynaptic Current
Min = Minute
miRNA = microARN
Mmu 10/16/17 = Chromosomes souris (*Mus Musculus*) 10/16/17
MNB = Minibrain
MRD7 = Mental Retardation autosomal Dominant 7
mRNA ou ARNm = Acide Ribonucléique messenger
N = Nord
NaOH = Hydroxyde de Sodium
NAPA = N-terminal Autophosphorylation Accessory Region
NCC = Neural Crest Cell
NE = Nord-Est

NEP = Dégradation Enzymes Neprilysin
NLS = Signal de Localisation Nucléaire
NOP = Novel Object Preference
ns = Non Significatif
NSC = Neural Stem Cells
NT = Souris Non Traitées
O = Ouest
OF = Open field = Test de Champ Ouvert
OPP = Object Place Preference
OMS = Organisation Mondiale de la Santé
PCO = Pilules Contraceptives Orales
PCR = Réaction de Polymérase en Chaîne
PD = Parkinson's Disease = Maladie de Parkinson
Pde10a = Phosphodiesterase 10A
Pdxk = Pyridoxal kinase
PEST = Motif riche en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S) et thréonine (T)
PIM = Provirus integration site for Moloney murine leukemia Kinase
pH = Potentiel Hydrogène
PIKK = Phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase
PMSF = Fluorure de Phénylméthylsulfonyle
Prmt2 = Protein Arginine Methyltransferase 2
PRP4 = Protein Kinase 4
PS1 = Presenilin-1
Psid = PA14 Domain-Containing Protein
PVALB = Parvalbumin
QI = Quotient Intellectuel
RMN = Résonance Magnétique Nucléaire
RNA ou ARN = Acide Ribonucléique
Rno 11/20 = Chromosomes rat (*Rattus norvegicus*) 11/20
ROCK = Rho-associated Protein Kinase
ROI = Régions d'intérêt
Rpm = Rotations Par Minute
Rrp1b = Ribosomal RNA Processing 1 homolog B
rs-fMRI = IRMf à l'état de repos
RT qPCR = Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction
S = Sud
S ou Ser = Sérine
SD ou DS = Syndrome de Down
SF3B1 = Splicing Factor 3b1
SEPT4 = Septin 4
SGK = Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase

shRNA = Short Hairpin RNA
SOD1 = Superoxide dismutase 1
SPM12 = Statistical Parametric Mapping 12
STE = Kinase from Cell Signaling Technology
Synj = Synaptojanin
T = Souris Traitées
T-f = Dp1Yey traités à la dose de 0.3 mg/kg/jour
T-F = Dp1Yey traités à la dose de 3 mg/kg/jour
T21 = Trisomie 21
T ou Thr = Thréonine
TAU = Tubulin-Associated Unit
TE = Temps d'écho
TFA = Acide Trifluoroacétique
Tg(*Dyrk1a*) = Tg(*Dyrk1a*)189N3YaH
Tiam2 = T lymphoma invasion and metastasis inducing gene 2
Tim1 = T-cell immunoglobulin and mucin domain 1
TK = Thymidine kinase
TR = Temps de répétition
Ts65Dn = Ts(17¹⁶)65Dn
Turbo RARE = Turbo Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement
Tyr = Tyrosine
UCHL1 = Ubiquitine carboxy-terminal hydrolase L1
Umodl1 = Uromodulin Like 1 precursor
UKA = Kinase en amont
VBM = Voxel
WDR68 = WD repeat-containing protein 68
wt = Wild-type
XIC = Extracted-ion Chromatogram
YAC = Yeast Artificial Chromosomes
Zbtb21 = Zinc finger and BTB Domain containing 21

Liste des Figures

Figure 1 : Évolution de la terminologie du syndrome de Down.....	17
Figure 2 : Prévalence du syndrome de Down aux États-Unis entre 1950 et 2013.	18
Figure 3 : Hypothèse de la sélection du mosaïcisme des ovocytes avec l'augmentation de la proportion d'ovocytes T21 dans l'ovaire âgé.	20
Figure 4 : Récapitulatif des facteurs de la vie reproductive des participants à l'étude.....	21
Figure 5 : Caryotype de Trisomie 21.	23
Figure 6 : Morphométrie crâniofaciale du syndrome de Down.....	25
Figure 7 : Dismorphies morphologiques d'un enfant porteur de la trisomie 21.	26
Figure 8: Les modèles souris du SD.....	40
Figure 9 : Représentation des régions chromosomiques chez la souris et le rat synténiques au Hsa21.	45
Figure 10 : Séquence peptidique de l'A β chez l'Homme et chez le rat.	46
Figure 11 : Arbre phylogénétique des classes de kinases CMGC avec un zoom sur la famille des kinases DYRK et CLK.....	50
Figure 12 : Schématisation de la structure des cinq protéines de la famille DYRK.....	51
Figure 13 : Structure de cristalline de DYRK1A.....	52
Figure 14 : Expression tissulaire de DYRK1A chez l'homme.....	53
Figure 15 : Mécanisme d'activation de DYRK1A.....	54
Figure 16 : Représentation des différents modèles souris et rats du SD utilisés dans ce projet.	96
Figure 17 : Image d'une éponge de calcaire, la <i>Leucetta microraphis</i> (A) et structure chimique de la Leucettamine B.	105
Figure 18 : Chronologie de l'étude de l'EMD10 sur le modèle Tg(Dyrk1a) pendant 19 jours de traitements.	108
Figure 19: Chronologie de l'étude de l'EMD10 sur le modèle Tg(Dyrk1a) pendant 10 jours de traitement.....	110
Figure 20: Chronologie de l'étude de l'EMD92 sur le modèle Tg(Dyrk1a).....	111
Figure 21: Chronologie de l'étude de l'EMD92 sur le modèle Dp1Yey.....	112
Figure 22 : Chronologie de l'étude de l'EMD173 sur le modèle Dp1Yey.....	113

Figure 23: Chronologie de l'étude de l'EMD173 sur les modèles rats du SD.	114
Figure 24: Dispositif du labyrinthe en Y	115
Figure 25 : Représentation schématique du protocole du test de l'OPP.....	118
Figure 26 : Représentation schématique du protocole du test du NOP.....	119
Figure 27 : Dispositif de la piscine de Morris	120
Figure 28 : Représentation schématique du protocole du test de la piscine de Morris.	122
Figure 29: Plan expérimental de l'analyse d'imagerie cérébrale réalisée sur le modèle Dp1Yey traité avec l'EMD92.	125
Figure 30 : Construction du modèle Dyrk1a-OST avec le système d'ingénierie Cre-loxP.....	136
Figure 31 : Principe du système de chromatographie d'affinité Strep-Tag.	140
Figure 32 : Synthèse des six études d'inhibiteurs de DYRK1A effectuées sur les modèles rongeurs du SD.	180
Figure 33 : Chronologie de l'étude de l'EMD10 sur le modèle Tg(<i>Dyrk1a</i>) pendant 19 jours de traitements.	182
Figure 34 : Distance parcourue dans le test du champ ouvert chez les souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) traitées avec l'EMD10.....	184
Figure 35 : Effet de l'EMD10 sur la mémoire spatiale des souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) mesurés dans le test de l'OPP.....	186
Figure 36 : Effet de l'EMD10 sur la mémoire de reconnaissance des souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) mesurée dans le test du NOP.	188
Figure 37 : Effet de l'EMD10 sur l'activité kinase de DYRK1A dans les extraits de cerveaux des souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) traitées pendant 19 jours.....	190
Figure 38 : Phosphorylation de TAU en Ser202/Thr205 dans l'hippocampe des souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) traitées avec l'EMD10.....	191
Figure 39 : Représentation de la statistique de la kinase DYRK1A et de la médiane de son score final dans les différents groupes wt ainsi que Tg(<i>Dyrk1a</i>) NT et T.....	193
Figure 40 : Profil d'activité du kinome chez les souris wt NT en comparaison aux souris wt T.	194
Figure 41 : Profil d'activité du kinome chez les souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) NT en comparaison aux souris wt NT.....	195
Figure 42 : Profil d'activité du kinome chez les souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) T en comparaison aux souris wt NT.....	197

Figure 43 : Profil d'activité du kinome chez les souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) T en comparaison aux souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) NT.	198
Figure 44 : Représentation du nombre de kinases dérégulées au sein des différentes comparaisons.	200
Figure 45 : Analyse des données d'UKA avec le logiciel MetaCore.	201
Figure 46 : Chronologie de l'étude de l'EMD10 sur le modèle Tg(<i>Dyrk1a</i>) pendant 10 jours de traitement.	202
Figure 47 : Distance parcourue dans le test du champ ouvert chez les souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) traitées avec l'EMD10.	204
Figure 48 : Effet de l'EMD10 sur la mémoire spatiale des souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) sur 10 jours de traitement.	206
Figure 49 : Effet de l'EMD10 sur la mémoire de reconnaissance des souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) mesurée dans le test du NOP.	207
Figure 50 : Chronologie de l'étude de l'EMD92 sur le modèle Tg(<i>Dyrk1a</i>).	208
Figure 51 : Effet de l'EMD92 sur l'activité locomotrice et la mémoire de travail des souris Tg(<i>Dyrk1a</i>).	210
Figure 52 : Distance parcourue dans le test du champ ouvert chez les souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) traitées avec l'EMD92.	211
Figure 53 : Effet de l'EMD92 sur la mémoire spatiale des souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) sur 10 jours de traitement.	212
Figure 54 : Effet de l'EMD92 sur la mémoire de reconnaissance des souris Tg(<i>Dyrk1a</i>) mesurée dans le test du NOP.	214
Figure 55 : Chronologie de l'étude de l'EMD92 sur le modèle Dp1Yey.	214
Figure 56 : Effet de l'EMD92 sur l'activité locomotrice et la mémoire de travail des souris Dp1Yey.	216
Figure 57 : Distance parcourue dans le test du champ ouvert chez les souris Dp1Yey traitées avec l'EMD92.	217
Figure 58 : Effet de l'EMD92 sur la mémoire spatiale des souris Dp1Yey sur 11 jours de traitement.	218
Figure 59 : Effet de l'EMD92 sur la mémoire de reconnaissance des souris Dp1Yey mesurée dans le test du NOP.	219

Figure 60 : Caractérisation de la morphologie cérébrale des souris Dp1Yey NT par rapport aux wt NT.....	221
Figure 61 : Impact de l'EMD92 sur la connectivité fonctionnelle des souris Dp1Yey après 11 jours de traitements.....	223
Figure 62 : Effet de l'EMD92 sur l'activité kinase de DYRK1A dans les extraits de cerveaux des souris Dp1Yey traitées pendant 11 jours.....	224
Figure 63 : Chronologie de l'étude de l'EMD173 sur le modèle Dp1Yey.....	225
Figure 64 : Distance parcourue dans le test du champ ouvert chez les souris Dp1Yey traitées avec l'EMD173.....	227
Figure 65 : Effet de l'EMD173 sur la mémoire de reconnaissance des souris Dp1Yey mesurée dans le test du NOP.....	229
Figure 66 : Effet de l'EMD173 sur l'activité kinase de DYRK1A dans les extraits de cerveaux des souris Dp1Yey traitées pendant 11 jours.....	230
Figure 67 : Profil d'activité du kinome chez les souris Dp1Yey NT en comparaison aux souris wt NT.....	232
Figure 68 : Profil d'activité du kinome chez les souris Dp1Yey T en comparaison aux souris Dp1Yey NT.....	234
Figure 69 : Chronologie de l'étude de l'EMD173 sur les modèles rats du SD.....	235
Figure 70 : Effet de l'EMD173 sur l'apprentissage spatial des rats Dup(Rno11)-APP ^{H3} et Dup(Rno11-20)-APP ^{H3}	238
Figure 71 : Effet de l'EMD173 sur la mémoire spatiale des rats Dup(Rno11)-APP ^{H3} et Dup(Rno11-20)-APP ^{H3} au cours du test de rappel de la piscine de Morris.....	241
Figure 72 : Effet de l'EMD173 sur l'activité kinase de DYRK1A dans les extraits de cerveaux des rats Dup(Rno11)-APP ^{H3} et Dup(Rno11-20)-APP ^{H3} traitées pendant 12-13 jours.....	243
Figure 73 : Étude des fractions de lavages et d'élutions du <i>pull-down</i> effectué à partir de demi-cerveau de souris wt et <i>Dyrk1a^{ost/ost}</i>	248
Figure 74 : Étude des fractions de lavages et d'élutions du <i>pull-down</i> effectué à partir d'un cerveau de souris wt et <i>Dyrk1a^{ost/ost}</i>	250
Figure 75 : Étude des fractions de lavages et d'élutions du second <i>pull-down</i> effectué à partir d'un cerveau de souris wt et <i>Dyrk1a^{ost/ost}</i>	251
Figure 76 : Validation du <i>pull-down</i> de DYRK1A par spectrométrie de masse.....	253

Figure 77 : Interaction entre DYRK1A ainsi que ses partenaires protéiques connus et identifiés dans les fractions d'élutions de la colonne <i>Dyrk1a^{ost/ost}</i>	254
Figure 78 : Interactions entre les 59 potentiels partenaires de DYRK1A identifiés dans les fractions d'élutions du « <i>pull-down</i> ».....	257
Figure 79 : Rôle de DYRK1A dans l'apoptose	273

Liste des Tables

Table 1 : Résultats de l'étude comportementale des modèles rats du SD avec l'humanisation de l'App	47
Table 2 : Composition du mix pour l'amplification d'ADN lors de la PCR de la lignée Tg(<i>Dyrk1a</i>)	98
Table 3 : Conditions de la PCR pour la lignée souris Tg(<i>Dyrk1a</i>)	98
Table 4 : Composition du mix pour l'amplification d'ADN lors de la PCR de la lignée Dp1Yey	99
Table 5 : Conditions de la PCR de la lignée souris Dp1Yey	99
Table 6 : Récapitulatif de la taille des bandes observées après migration sur gel d'agarose	100
Table 7 : Condition de la ddPCR pour la duplication du Rno11	101
Table 8 : Séquences des amorces et des sondes pour le génotypage par ddPCR de la duplication de la région du Rno11 et de l'APP ^H	102
Table 9 : Séquences des amorces et des sondes utilisées pour le génotypage par ddPCR de la duplication de la région du Rno20	103
Table 10 : Volumes administrés en fonction de la masse corporelle des modèles souris du SD	105
Table 11 : Volumes administrés en fonction de la masse corporelle des modèles rats du SD	106
Table 12 : Effectif des animaux par groupe et par sexe pour l'étude de l'EMD10 sur le modèle Tg(<i>Dyrk1a</i>) pendant 19 jours de traitements	108
Table 13 : Effectif des animaux par groupe et par sexe pour l'étude de l'EMD10 sur le modèle Tg(<i>Dyrk1a</i>) pendant 10 jours de traitement	109
Table 14 : Effectif des animaux par groupe et par sexe au cours de l'étude de l'EMD92 sur le modèle Tg(<i>Dyrk1a</i>) pendant 10 jours de traitement	110
Table 15 : Effectif des animaux par groupe au cours de l'étude de l'EMD92 sur le modèle Dp1Yey pendant 11 jours de traitement	111
Table 16 : Effectif des animaux par groupe et par sexe au cours de l'étude de l'EMD173 sur le modèle Dp1Yey pendant 11 jours de traitement	112
Table 17 : Effectif par groupe et par sexe au cours de l'étude de l'EMD173 sur les modèles rats du SD	113
Table 18 : Composition du mix pour l'amplification d'ADN lors de la PCR de la lignée <i>Dyrk1a</i> -OST	137
Table 19 : Conditions de la PCR de la lignée souris <i>Dyrk1a</i> -OST	137
Table 20 : Synthèse des résultats de l'étude des nouveaux inhibiteurs de DYRK1A chez les modèles rongeurs du SD	244
Table 21 : Ratio <i>Dyrk1a</i> ^{ost/ost} sur wt des partenaires protéiques connus de DYRK1A identifiés dans les fractions d'élutions de la colonne <i>Dyrk1a</i> ^{ost/ost}	253
Table 22 : Potentiels partenaires protéiques de DYRK1A présents dans les fractions d'élutions de la colonne <i>Dyrk1a</i> ^{ost/ost}	254

Introduction

Chapitre 1 : Le syndrome de Down

I. Du « crétinisme » au syndrome de Down

Les traits évoquant le syndrome de Down (SD) communément appelé Trisomie 21 (T21), ont été pour la première fois rapportés par le médecin français Jean-Etienne-Dominique Esquirol en 1838 (Esquerol, 1838). Dix ans plus tard, le pédagogue français Edouard Seguin a apporté une description plus avancée des caractéristiques cliniques du SD. En 1846, le terme « crétinisme furfuracé » est utilisé pour désigner la pathologie faisant référence à la « peau laiteuse, rosée et qui pèle ». C'est en 1866 que le médecin britannique John Langdon Down sera le premier à fournir une description formelle des traits cliniques du syndrome qu'il qualifiera alors de « mongolisme ». En 1958, grâce aux nouvelles techniques d'étude du caryotype humain, l'origine génétique du SD est identifiée par l'équipe du Dr. Turpin composé alors du Dr. Marthe Gautier et du généticien français Jérôme Lejeune. L'équipe met en évidence la présence d'une copie surnuméraire d'un chromosome encore inconnu (Lejeune, Turpin, et Gautier 1959). Ce chromosome supplémentaire sera identifié deux ans plus tard par la même équipe comme étant le chromosome 21 (Homo Sapiens 21, Hsa21). En France, le Dr. Jérôme Lejeune renommara le terme « mongolisme » par « Trisomie 21 ». En 1965, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) adoptera la terminologie de syndrome de Down (**Figure 1**).

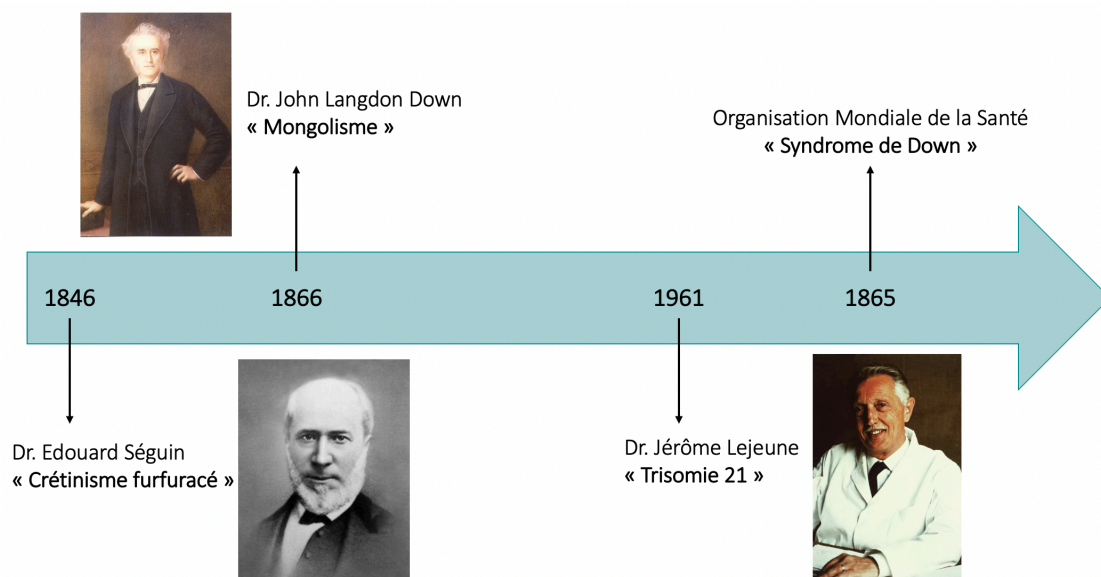


Figure 1 : Évolution de la terminologie du syndrome de Down.

II. Épidémiologie du syndrome de Down

1. Prévalence

Le SD est la principale cause de retard intellectuel d'origine génétique dans le monde, affectant 1 naissance sur 700. En Europe, ce chiffre est de 1 sur 1 000 naissances et 1 sur 800 aux États-Unis (Khoshnood et al. 2011; Antonarakis et al. 2020). Malgré le dépistage prénatal, la prévalence du SD dans la population mondiale augmente. En effet, aux États-Unis, le nombre de cas est passé de 50 000 en 1950 à 212 000 en 2013 (**Figure 2**). En Europe en 2015, pour 10 000 individus, 4.9 sont affectés par ce syndrome (Antonarakis et al. 2020). Cette augmentation s'explique par l'amélioration de la survie infantile, ce qui impacte également la répartition par âge des personnes avec SD (de Graaf, Buckley, et Skotko 2017). En 1950, seulement 27% avait plus de 20 ans et 4% plus de 40 ans, contre 57% et 28% respectivement en 2010. L'amélioration de la prise en charge des différents symptômes et la qualité de vie des personnes porteuses de T21 a conduit à une augmentation de leur espérance de survie. Aux États-Unis, l'espérance de vie est passée d'environ 26 ans en 1950, à 54 ans en 2010 (de Graaf, Buckley, et Skotko 2017).

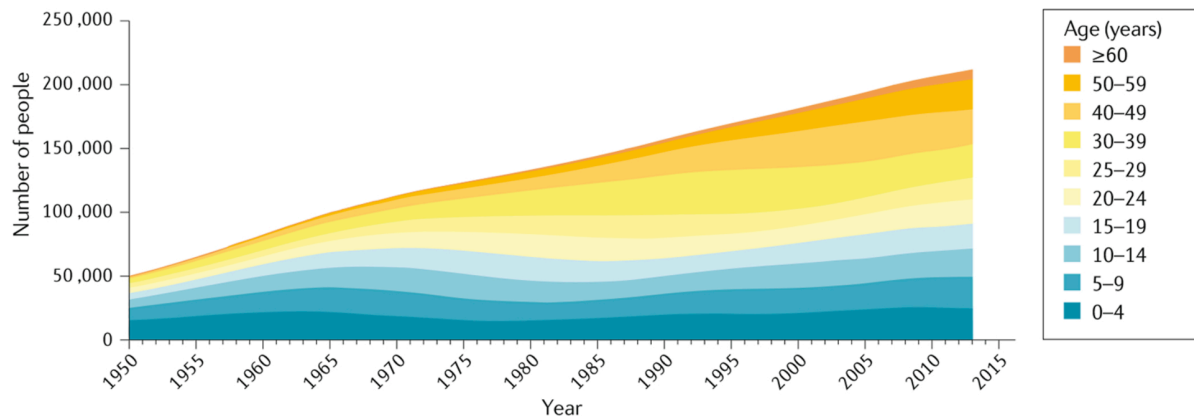


Figure 2 : Prévalence du syndrome de Down aux États-Unis entre 1950 et 2013.

(Antonarakis et al. 2020).

Le SD survient dans toutes les populations mondiales mais sa prévalence est impactée par de nombreux facteurs tels que le statut socio-économique, les pratiques religieuses, l'accès au diagnostic anténatal, la survie infantile ou encore des lois régissant la possibilité d'interruption médicale de grossesse.

L'âge de la mère au cours de la conception est le risque majeur augmentant la prévalence du SD. Cela est dû au risque plus élevé d'avoir des ovocytes présentant une disomie du chromosome 21 (Hultén et al. 2010). Néanmoins, certaines des grossesses conduiront à des fausses couches spontanées dépendant de l'âge de la mère. La perte du fœtus entre 10 semaines de gestation et la date présumée de naissance est de 32% pour les femmes âgées de 25 ans et augmente à 44% pour les femmes âgées de 45 ans (Savva et al. 2006). Le taux d'interruption médicale de grossesse dépend de la disponibilité et l'exactitude des tests de dépistage dans chaque pays mais aussi des décisions parentales. En 2013, le nombre d'interruptions volontaires de grossesse était de 3 400 aux États-Unis, réduisant de 33% le nombre d'enfants porteurs de T21 (Antonarakis et al. 2020). De la même manière, en 2004, ce pourcentage est estimé à 55% et 54% en Australie et en Europe respectivement (Bittles et al. 2007). En Chine, entre les années 2003 et 2011 le taux d'interruption volontaire de grossesse chez les fœtus porteur du SD a entraîné une réduction de 55% de la prévalence périnatale (Deng et al. 2015).

2. Facteurs de risques

2.1. Âge maternel avancé

Comme souligné dans le paragraphe précédent, l'âge de la mère lors de la conception du fœtus est un facteur de risque majeur du SD comme pour d'autres trisomies (Nagaoka, Hassold, et Hunt 2012). Chez les mammifères, les ovocytes des femelles âgées sont confrontés à des risques plus élevés d'erreurs de ségrégation chromosomique provoquant le SD, comme la perte de cohésion centromérique (Wang, Schatten, et Sun 2011). La perturbation de la cohésion centromérique entraîne un risque de séparation précoce des chromatides sœurs et une ségrégation inverse chez les femmes âgées (Gruhn et al. 2019).

Le mécanisme expliquant pourquoi cette aneuploïdie est plus fréquente chez les mères âgées, n'est pas encore clarifié. Une hypothèse a été proposée en 2010 : la sélection du mosaïcisme des ovocytes (**Figure 3**) en anglais « *Oocyte Mosaicism Selection* » (Hultén et al. 2010). Cette théorie se base sur le fait que la proportion d'ovocytes T21 n'est pas sélectionnée au cours de l'ovulation durant les premiers cycles menstruels. Les ovocytes trisomiques vont s'accumuler par rapport aux ovocytes disomiques qui eux diminuent au fur et à mesure. Ces ovocytes trisomiques constitueraient donc une majorité dans la réserve ovarienne d'une femme âgée. Ils sont la conséquence d'un affaiblissement de la configuration bivalente des chromosomes homologues pendant la prophase méiotique I. Au cours cette période statique, les ovocytes sont maintenus pendant des années à la phase de transition G2/M (stade dictyotène de la prophase I). Lorsque la configuration bivalente est affaiblie cela conduit à une erreur de ségrégation chromosomique quand la méiose reprend (maturation de l'ovocyte) (Cimadomo et al. 2018). Par conséquent, la probabilité d'avoir un ovule avec une aneuploïdie augmente avec l'âge maternel.

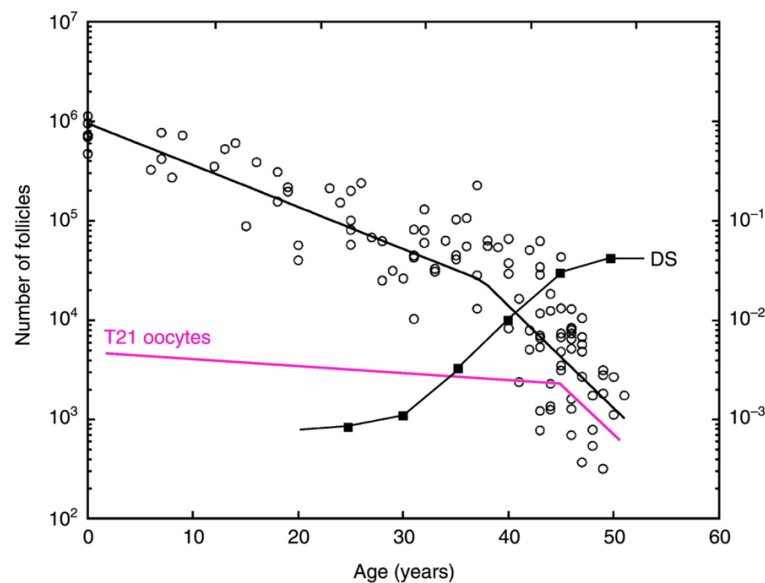


Figure 3 : Hypothèse de la sélection du mosaïcisme des ovocytes avec l'augmentation de la proportion d'ovocytes T21 dans l'ovaire âgé.

La figure illustre le nombre prédit d'ovocytes T21 de la naissance à la ménopause (ligne rose) par rapport au total (cercles) basé sur le nombre de follicules (axe Y gauche). L'incidence observée (axe Y droit) des naissances T21 (carrés pleins) est représentée par les données de Morris et al. (Morris et al. 2012).

2.2. Environnement

Les facteurs environnementaux influencent également le risque de T21. Ils sont plus difficiles à identifier et à quantifier, mais comprennent notamment le tabagisme (Yang et al. 1999), le manque de supplémentation en acide folique (Hollis et al. 2013) ou encore l'utilisation de contraceptifs oraux.

Concernant les pilules contraceptives orales (PCO), l'équipe du Dr. Martinas-Frias a analysé le risque de SD chez les nourrissons dont la mère prenait des PCO (Martínez-Frías et al. 2001). Les résultats ont montré que le risque de SD chez les nourrissons nés de mères de moins de 35 ans tombées enceintes pendant la prise de PCO est proche du risque du SD chez les mères de plus de 35 ans, âge pour lequel le diagnostic prénatal est conseillé. Il semblerait donc que la prise de PCO n'impacte pas les femmes âgées de plus de 35 ans mais que les hormones oestro-progestatives ont un impact négatif chez la femme plus jeune.

Les études de 2013 et 2017 de l'équipe du Dr. Nagy de Budapest (Nagy et al. 2013; Horányi et al. 2017) ont portées sur les facteurs qui influencent le nombre d'ovulations et leur risque de trisomies. L'étude de 2017 a permis d'exclure d'autres facteurs de risques de trisomies tel que le tabagisme (Yang et al. 1999). Ces études recueillent des données sur des personnes d'âge maternel avancé (≥ 35 ans) dont la trisomie foétale 21, 18 ou 13 était confirmée (**Figure 4**). Il a été montré et cela à deux reprises, que l'utilisation prolongée de la PCO diminue le nombre de cycles ovulatoires résultant de ce fait par des caryotypes foétaux sains chez les femmes âgées. Les résultats de ces études sont cohérents avec la théorie du mosaïcisme ovarien maternel discutée dans la partie précédente.

Patient group	Maternal age, y	Length of oral contraceptive use, y	Age at time of menarche, y	Menstrual cycle length, d	No. of deliveries	No. of spontaneous abortions	No. of induced abortions	EON
Control (n=100)	37.2±0.2	6.0±0.5	12.9±0.1	28.1±0.2	1.3±0.1	0.3±0.1	0.5±0.1	224.1±7.6
All trisomies (n=35)	38.8±0.4	3.2±0.7	13.3±0.3	27.8±0.4	1.7±0.2	0.5±0.1	0.4±0.1	258.5±11.6
<i>P</i> value ^b	0.024	<0.001	0.257	0.845	0.052	0.119	0.403	0.012
Trisomy 21 only (n=26)	38.5±0.4	3.1±0.9	13.2±0.2	28.3±0.4	1.6±0.2	0.5±0.1	0.3±0.1	258.4±15.3
<i>P</i> value ^b	0.167	<0.001	0.318	0.793	0.193	0.327	0.287	0.023
Trisomy 18 or 13 only (n=9)	39.6±1.3	3.4±0.9	13.5±0.8	28±0	1.9±0.3	0.6±0.2	0.7±0.4	258.8±15.3
<i>P</i> value ^b	0.016	0.133	0.505	0.954	0.059	0.089	0.912	0.183

Figure 4 : Récapitulatif des facteurs de la vie reproductive des participants à l'étude.

EON = estimation du nombre d'ovulations. Les valeurs représentent des moyennes \pm erreur type de la moyenne. Les *p* valeurs ont été calculées avec le test de Mann-Whitney.

III. Origine génétique du syndrome de Down

La copie surnuméraire du Hsa21 dans le SD provient d'une non-disjonction de l'un des deux chromosomes de la paire 21 due à une altération de la division mitotique ou méiotique. En fonction de l'origine génétique du syndrome, trois formes de trisomie peuvent être observées : la trisomie libre, la trisomie mosaïque et la trisomie transloquée.

1. Les différentes formes

1.1 Trisomie libre

La trisomie libre concerne la majorité des cas (92 à 95%). Dans cette forme le Hsa21 surnuméraire est entier et le caryotype est donc de 47 chromosomes comme présenté sur la **Figure 5A**. Cette trisomie affecte toutes les cellules de l'organisme.

1.2 Trisomie mosaïque

La trisomie mosaïque affecte 2 à 4 % des cas de SD. Dans ce type de trisomie, les cellules sont alors divisées en deux populations : l'une euploïde et l'autre possédant une troisième copie du Hsa21. Ici, les traits cliniques du porteur de la trisomie varient en fonction de la proportion de mosaïcisme et de la répartition tissulaire des cellules trisomiques.

1.3 Trisomie transloquée

La trisomie transloquée dite aussi translocation Robertsonienne correspond à la fusion de deux chromosomes acrocentriques. Cette forme de trisomie est présente dans 3 à 5% des porteurs du SD. Dans ce cas, une copie surnuméraire du chromosome 21 va fusionner avec un autre chromosome généralement acrocentrique comme le chromosome 14 (**Figure 5B**). L'origine de cette forme est 50% congénitale et 50% parentale. Dans le cas familial, le parent ayant une translocation équilibrée (un chromosome libre unique et le second fixé) est habituellement normal physiquement et cognitivement, mais peut transmettre la translocation sous une forme déséquilibrée (Plaiasu 2017).

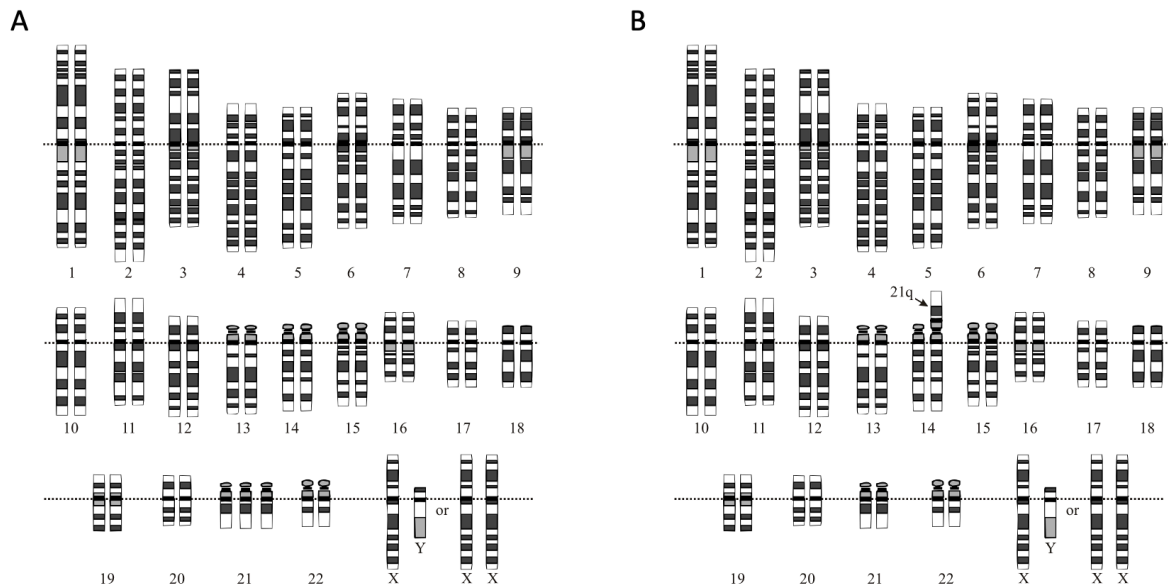


Figure 5 : Caryotype de Trisomie 21.

(A) Trisomie complète libre. (B) Trisomie 21 avec une translocation Robertsonienne 14/21. Le bras long du chromosome 21 (21q) surnuméraire est fusionné au bras court du chromosome 14. Images issues du *Human Genome Project*.

2. Origine génétique

La non-disjonction à l'origine du SD et d'autres aneuploïdies fait référence à l'impossibilité des paires de chromosomes à se séparer lors de la division cellulaire. Ce phénomène peut avoir lieu au cours de la méiose ou de la mitose.

2.1 Non-ségrégation au cours de la méiose

Les erreurs de ségrégation des chromosomes peuvent avoir lieu au cours de la méiose I ou II. Les conséquences sont plus importantes si la mauvaise ségrégation a lieu au cours de la méiose I. Dans ce cas, toutes les cellules filles sont alors aneuploïdes. Les erreurs de méiose qui induisent le SD sont majoritairement d'origine maternelle (90% des cas), alors que seulement une petite fraction (10% des cas) surviennent durant la spermatogenèse (Petersen et Mikkelsen 2000). Concernant les erreurs méiotiques maternelles, 75% ont lieu au cours de la méiose I et 25% au cours de la méiose II (S. E. Antonarakis et al. 1992; Yoon et al. 1996).

2.2 Non-ségrégation au cours de la mitose

Les autres cas de trisomie, environ 5%, ont lieu au cours de la mitose après la formation du zygote (S. E. Antonarakis et al. 1992). En général, si l'erreur de ségrégation a lieu au cours de la mitose, cela conduit majoritairement à l'arrêt du développement embryonnaire et cellulaire avant la formation du blastocyste (McCoy et al. 2015). Si l'erreur de ségrégation ne conduit pas à l'arrêt du développement embryonnaire, alors l'enfant portera soit une trisomie mosaïque, soit une trisomie complète. En effet, pour cette dernière, si la mal-ségrégation a lieu au cours des premières divisions, seules les cellules trisomiques survivront contrairement aux cellules n'ayant plus qu'un chromosome 21.

IV. Signes cliniques et cognition du syndrome de Down

Le SD est un syndrome très complexe qui touche les différentes fonctions de l'organisme. Du fait de sa complexité génétique, les phénotypes observés sont de fréquence et d'intensité différentes entre individus porteurs de cette trisomie. En effet, le SD affecte un large spectre de signes cliniques mais avec trois principaux phénotypes toujours retrouvés chez les personnes : la déficience intellectuelle, la dysmorphie physique et l'hypotonie musculaire.

1. Dysmorphies physiques

Du fait des dysmorphies morphologiques, les individus porteurs de la T21 ont des caractéristiques physiques facilement identifiables impliquant des anomalies crâniofaciales, du cou et des membres. Les porteurs du SD présentent une microcéphalie, c'est-à-dire une diminution de la taille de la tête, liée à une brachycéphalie, un élargissement aberrant de la calotte crânienne dans le diamètre transversal (Shukla et al. 2014) (**Figure 6**). Cette dernière est présente chez 90% des cas et peut être évaluée dans des études de neuroimagerie (Pavarino Bertelli et al. 2009; Weijerman et de Winter 2010). Les porteurs de la T21 présentent une tête petite ronde et un visage aplati (**Figure 7A**). Les fentes des paupières sont obliques donnant une forme d'amande aux yeux qui sont également très écartés. De plus, le coin interne de l'œil s'accompagne d'un repli cutané formant comme une troisième paupière aussi nommée épicanthus (**Figure 7B**). Les porteurs de la T21 ont souvent un strabisme ou un nystagmus

(mouvements pendulaires anormaux des yeux) et leurs iris peuvent présenter des tâches blanches dites de Brushfield (Ting 2011). Les oreilles, ancrées plus basses au niveau de la tête, sont tombantes. Les pavillons des oreilles sont petits et mous avec des conduits auditifs étroits. Le nez présente une forme aplatie. La bouche est petite et entrouverte du fait d'une protrusion de la langue due à une hypertrophie, aussi appelée macroglossie. Le cou peut être court et large et présenter un excès de peau. Les mains, souvent trapues, présentent une inclinaison du 5^{ème} doigt vers l'intérieur, appelée hypoplasie. Une brachymésophalangie est visible car les phalanges du milieu sont plus courtes, entraînant de ce fait des doigts plus courts. Dans la paume de la main, un unique pli palmaire transverse peut être observé (Figure 7C). Les pieds sont aussi plus courts avec un grand espace entre les deux premiers orteils (Figure 7D). Une mauvaise implantation d'un ou plusieurs orteils peut également être observée. Des syndactylies, c'est-à-dire une fusion de deux doigts ou orteils, peuvent fréquemment être observées au niveau des mains ou des pieds (Sureshbabu et al. 2011).

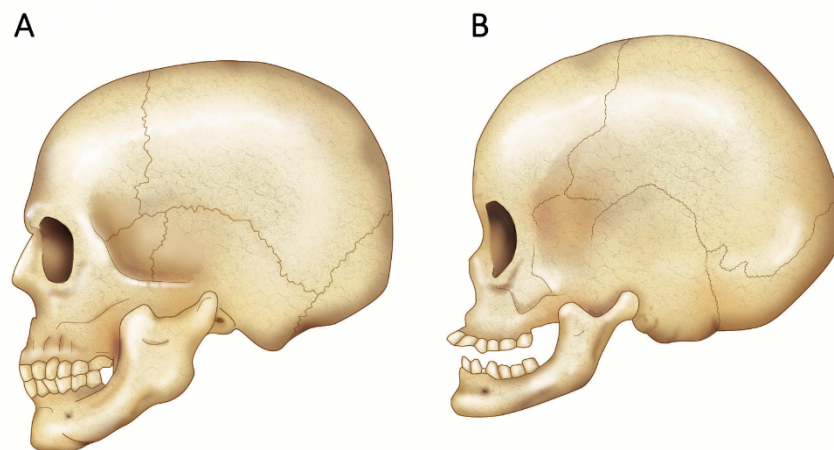


Figure 6 : Morphométrie crâniofaciale du syndrome de Down.

(A) Vue crâniofaciale latérale d'un jeune adulte euploïde. (B) Vue crâniofaciale latérale d'un porteur de T21 avec une brachycéphalie définie par une « tête courte ». (Dierssen, Herault, et Estivill 2009).

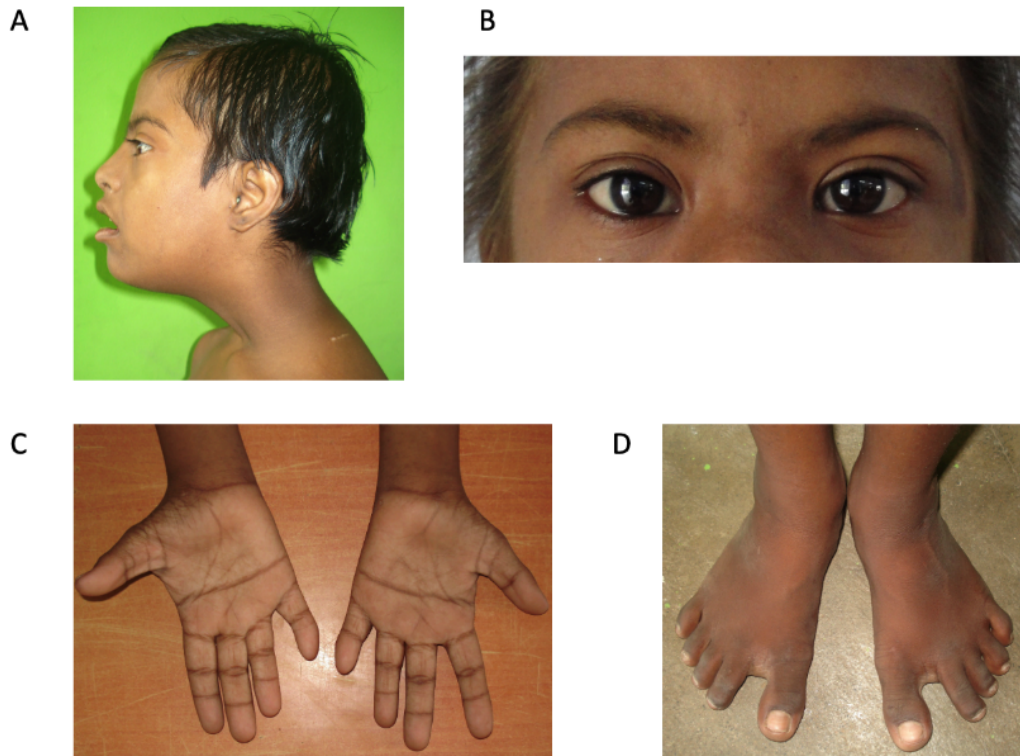


Figure 7 : Dismorphies morphologiques d'un enfant porteur de la trisomie 21.

(A) Brachycéphalie. (B) Epicanthus interne. (C) Unique pli palmaire transverse, hypoplasie de la deuxième phalange de l'auriculaire. (D) Espace entre le premier et le deuxième orteil. (Sureshababu et al. 2011).

2. Déficience intellectuelle

En 2002, l'Association Américaine des Déficiences Intellectuelles et Développementales définit la déficience intellectuelle par « des délimitations au rendement intellectuel (raisonnement et résolution de problèmes) et aux comportements adaptatifs (capacités de s'adapter au quotidien et de vivre dans la communauté) ». La déficience intellectuelle est reconnue comme la caractéristique la plus importante du SD (Stefano Vicari 2006) et le SD est l'étiologie génétique la plus répandue des déficiences intellectuelles (Pulsifer 1996; Anderson et al. 2013; Daunhauer et al. 2014). Dans le SD, les déficits intellectuels sont des troubles du développement d'intensité variable qui se manifestent au cours de l'enfance et affectent différents aspects cognitifs.

2.1 Quotient intellectuel

Le quotient intellectuel ci-après QI, est un score représentant le rapport entre l'âge mental et l'âge réel d'un individu, évalué par un test psychométrique. Le test du QI est utilisé dans le SD pour mesurer l'intensité de la déficience intellectuelle. Même si ce test est le plus souvent utilisé, il faut noter que d'autres méthodes existent pour mesurer les déficiences intellectuelles. Par exemple, le test de « *Raven's Progressive Matrices* » qui est un test non-verbal permettant de mesurer l'intelligence générale et le raisonnement abstrait ou encore le « *Bayley Scales of Infant Development* » qui est utilisé pour les jeunes enfants de 1 à 42 mois afin d'évaluer leur compétences mentales, comportementales et motrices.

Le QI moyen d'un individu porteur de la T21 est de 50. Toutefois, il y aura une grande variabilité interindividuelle allant d'un niveau modéré avec QI de 70 jusqu'à un niveau sévère défini par un QI de 30 (S. Vicari, Marotta, et Carlesimo 2004; The Down Syndrome Cognition Project et al. 2021). La variabilité du QI est principalement expliquée par la complexité génétique du SD mais peut aussi provenir des différences dans la qualité de vie de l'enfant durant son développement qui dépendent de son environnement et du cadre de vie plus ou moins stimulant apporté par son entourage. De plus, les études sur les déficits cognitifs des porteurs de T21 ont mis en évidence une diminution des scores du QI à mesure que leur développement progresse. En effet, les enfants avec la T21 ont un QI entre 45 et 71 en moyenne, alors que les adolescents et jeunes adultes sont dans une fourchette de 28-47 mettant ainsi en évidence une diminution du QI avec l'âge (S. Vicari, Marotta, et Carlesimo 2004). Les adolescents et les jeunes adultes atteints du SD peuvent en outre présenter une régression cognitive rapide qui peut être soudaine ou progressive. Cette régression est caractérisée par une réduction de la parole dans 87% des cas (38% avec une régression et 52% souffrant de mutisme), une catatonie dans 47% des cas, ou encore des symptômes de l'humeur dont la dépression (42%), le retrait social (34%) et l'anxiété (16%) (Mircher et al. 2017; Handen et al. 2021).

2.2 Fonctions exécutives et attention

Les fonctions exécutives désignent des processus cognitifs de haut niveau impliqués dans le comportement axé sur des objectifs. Elles permettent la flexibilité et l'adaptation du comportement en fonction des informations. Les fonctions exécutives font référence à

l'inhibition comportementale, la planification, la mémoire de travail ou encore l'attention (Tungate et Connors 2021).

Des difficultés dans la réalisation des fonctions exécutives dans le SD ont été mises en évidence (S. Lanfranchi et al. 2010; Rowe, Lavender, et Turk 2006). En effet, chez les porteurs de T21 les fonctions exécutives, telles que l'inhibition de la réponse, sont altérées (Fontana et al. 2021). Les enfants porteurs de T21 peuvent présenter des comportements non adaptés aux situations incomprises, reflétant une détérioration de leurs compétences d'inhibition (Borella, Carretti, et Lanfranchi 2013). Une étude réalisée sur 22 participants avec le SD a mis en évidence une altération de leur flexibilité cognitive (Campbell et al. 2013). Au Royaume-Uni, des travaux ont montré que les porteurs de T21 ont une atteinte de leurs capacités de planification et d'attention (Rowe, Lavender, et Turk 2006).

La mémoire de travail, composante de la fonction exécutive, permet le maintien temporaire et en même temps la manipulation de l'information lors de la réalisation d'une tâche nécessitant plusieurs étapes. Elle intervient dans les tâches telles que la planification, les interactions sociales, le raisonnement ou encore la compréhension (Baddeley 2010). Cette mémoire est connue pour être altérée dans le SD (Rowe, Lavender, et Turk 2006; S. Lanfranchi et al. 2010; Borella, Carretti, et Lanfranchi 2013). En effet, la mémoire de travail relative au langage est atteinte chez les adolescents et adultes affectés par le SD. Les erreurs d'intrusion verbale sont des réponses non pertinentes faites lors de la récupération de la mémoire verbale ou de la production du langage. La production de ces erreurs au cours d'une tâche verbale est une caractéristique des adultes porteurs de T21 (Kittler, Krinsky-McHale, et Devenny 2006). Une étude visant à évaluer la mémoire de travail verbale et visuospatiale, ainsi que la combinaison des deux à la fois, a été réalisée sur 45 individus touchés par le SD. En plus d'une altération de la mémoire de travail verbale, les résultats ont révélé un déficit dans la combinaison des deux modalités, suggérant un déficit exécutif central dans le SD (Silvia Lanfranchi, Jerman, et Vianello 2009).

2.3 Mémoire à long terme

La mémoire à long terme est scindée en deux avec la mémoire explicite et la mémoire implicite. La mémoire explicite est composée d'une part de la mémoire sémantique qui correspond aux connaissances pratiques et théoriques acquises et conservées au cours de la

vie, et d'autre part, la mémoire épisodique – dite aussi déclarative – qui correspond aux souvenirs des événements vécus. La mémoire implicite, quant à elle, est une mémoire acquise, qui est utilisée inconsciemment. Elle permet l'apprentissage procédural ainsi que non-associatif, les conditionnements, et affecte les pensées et les comportements.

Les différents tests de mémoire réalisés sur les individus atteints du SD ont révélé une altération uniquement de la mémoire explicite dans le SD. En effet, contrairement à cette dernière, aucun déficit de la mémoire implicite n'a été observé dans la T21 (Carlesimo, Marotta, et Vicari 1997; Stefano Vicari, Bellucci, et Carlesimo 2000).

3. Hypotonie musculaire

Presque toutes les personnes atteintes de SD souffrent d'hypotonie musculaire, c'est-à-dire, un état de tonus musculaire diminué, généralement lié aux muscles squelettiques. En raison de cette hypotonie, des problèmes de mastication (dus à un mauvais contrôle neuromusculaire), une faiblesse musculaire et des anomalies dentaires sont également fréquentes dans le SD (Faulks et al. 2008). De plus, des retards de développement tels que l'apprentissage de la marche, la préhension des objets ou encore du langage du fait de difficultés dans l'articulation de la mâchoire ont été rapportés (Melyn et White 1973). Par ailleurs, la perte de tonus musculaire entraîne une hyperlaxité ligamentaire conduisant à une diminution de l'habileté et donc une perte de contrôle dans les mouvements (Stefano Vicari 2006). Les enfants atteints du SD n'acquièrent généralement pas les habiletés motrices au même rythme que les enfants ayant un développement normal et l'écart devient plus important avec l'âge. Par exemple, l'étude de Melyn et White en 1973 montre que les nourrissons avec la T21 marchent de manière autonome entre 15 et 74 mois contre un maximum de 18 mois pour les enfants ayant un développement normal.

4. Comorbidités associées au syndrome de Down

En plus des trois traits cliniques détaillés précédemment et présents chez la totalité des porteurs du SD, ces derniers peuvent développer d'autres problèmes de santé affectant le cœur, les intestins, les poumons, le système immunitaire ou encore les sens tels que la vision et l'audition (Stylianos E. Antonarakis et al. 2020; Bull 2020). Certaines comorbidités associées au SD sont listées et détaillées dans cette partie.

4.1 Malformations cardiaques

Les malformations cardiaques congénitales sont présentes chez environ 50 % des personnes atteintes du SD (Frid et al. 1999; Weijerman, Broers, et van der Plas 2013; Brodwall et al. 2018). Le risque d'atteinte septale sont les plus courantes avec les défauts de la communication interauriculaire (32,5 %), la communication interventriculaire (20,6 %) ainsi que les défauts de la communication auriculo-ventriculaire (17,4 %) (Heinke et al. 2021). La grande majorité de ces malformations cardiaques nécessitent une intervention chirurgicale, le plus souvent dans la petite enfance. En effet, à mesure que la réparation cardiaque complète dans la petite enfance devenait plus courante pour les grands défauts septaux, il a été constaté que les patients atteints du SD toléraient généralement bien la chirurgie. Par conséquent, de plus en plus de nourrissons atteints du SD et de malformations cardiaques congénitales ont été référés pour une intervention chirurgicale (Santos et al. 2019).

Par ailleurs, même si chez certains individus trisomiques, aucune malformation cardiaque n'est détectée à la naissance, ils peuvent développer à l'âge adulte des problèmes valvulaires. En effet, une étude réalisée sur 30 adultes japonais porteurs de la T21 sans symptômes cardiaques a montré une incidence de 26,7% de prolapsus de la valve mitrale et de 16,7% de régurgitations mitrales qui peuvent provenir d'une faiblesse de la valve mitrale (Hamada et al. 1998). Ces résultats ont mis en évidence des risques de maladie valvulaire chez les personnes adultes porteurs du SD.

4.2 Pathologies pulmonaires

Un sondage australien réalisé entre 1997 et 2004 auprès de parents d'enfants porteurs de T21, a permis de montrer que sur 208 enfants, 60% étaient touchés par des complications respiratoires telles que l'asthme et l'apnée du sommeil (K. Thomas et al. 2011). Par ailleurs, une étude rétrospective d'une cohorte de 1242 enfants atteints du SD révèle que l'hypertension pulmonaire est fréquente chez ces enfants (28% des cas). L'hypertension observée est généralement transitoire et liée à une coronaropathie ou à une hypertension pulmonaire du nouveau-né. Cependant, elle peut récidiver lorsqu'une autre maladie respiratoire apparaît, telles que l'apnée obstructive du sommeil, l'hypoxie intermittente ou encore la pneumonie récurrente (Bush et al. 2018).

4.3 Troubles de l'audition et de la vision

Dans l'ensemble, les enfants et les adultes atteints du SD ont une incidence significativement plus élevée de perte auditive (38 % à 78 %) que la population générale (2,5 %) (Lagan et al. 2020). Ces troubles de l'audition peuvent conduire à un retard d'acquisition de la parole et du langage des enfants porteurs de la T21. La T21 engendre deux problèmes majeurs de l'audition : la surdité de transmission, provenant d'une altération de la transmission des sons, et la surdité neurosensorielle qui est la conséquence d'anomalies de la structure sensorielle et nerveuse de la cochlée (X.-Q. Chen et al. 2021). Les enfants porteurs de la T21 ont également un risque accru de développer des otites. En effet, des otites moyennes avec épanchement ont été retrouvées chez 38% des enfants. Ces derniers présentaient par ailleurs un niveau d'audition significativement plus faible que les enfants sains (Austeng et al. 2013).

Concernant le sens de la vision, de nombreuses anomalies ophtalmologiques apparaissent dans le SD. Ces anomalies peuvent être congénitales ou apparaître tout au long de la vie des individus. Elles touchent 38% des enfants de moins de 1 an, et jusqu'à 80% des enfants âgés de 5 à 12 ans (Lagan et al. 2020). Les anomalies observées sont dans 80% des cas, des erreurs de réfraction, avec de l'hypermétropies (55%), de l'astigmatisme (44%), de la myopie (25%) et de l'anisométrie (19%) (Paudel et al. 2010). Les cataractes, les kératocônes ou encore des amblyopies sont également courants chez les porteurs de la T21 (Bull et the Committee on Genetics 2011; Watt, Robertson, et Jacobs 2015).

4.4 Troubles du sommeil

Des perturbations du sommeil sont présents dans le SD. En effet, une étude réalisée sur 107 enfants âgés entre 7 et 17 ans a montré que 65% d'entre eux présentaient des troubles du sommeil. Les enfants souffrant d'autres comorbidités tels que l'asthme ou encore l'autisme, présentent plus de problèmes de sommeil que les enfants sans ces comorbidités (Hoffmire et al. 2014). Les personnes atteintes du SD sont également susceptibles de développer l'apnée obstructive du sommeil en raison d'une combinaison de facteurs morphologiques et neuromoteurs, tels que l'hypoplasie médio-faciale, la macroglossie ou encore l'hypotonie musculaire (C.-F. Lee et al. 2018).

4.5 Anomalies gastro-intestinales

Les porteurs de la T21 sont aussi susceptibles de présenter des malformations gastro-intestinales avec une incidence de 6%. Les anomalies gastro-intestinales observées peuvent être une sténose (absence partielle) ou une atrésie (absence complète) de la lumière du duodénum (Fabia et Drolette 1970). Une forte corrélation entre le SD et la maladie cœliaque a été établie, avec une augmentation de l'incidence de 5 à 16 fois chez la proportion de personnes trisomiques par rapport à la population non trisomique (Book et al. 2001; Szaflarska-Popławska et al. 2016; Zachor, Mroczek-Musulman, et Brown 2000).

4.6 Cancer

Bien qu'il n'y ait pas de différence dans l'incidence globale du cancer parmi la population SD par rapport à la population saine, le SD est associé à une diminution de l'incidence des tumeurs solides et à une augmentation de l'incidence des hémopathies malignes, en particuliers des leucémies aiguës. Pour cette raison, les enfants atteints du SD courent un risque nettement plus accru de développer une leucémie aiguë par rapport aux autres. En effet, les leucémies se manifestent dans 2-3% des cas. Elles correspondent à 96% des cancers chez les enfants de moins de 4 ans porteurs de la T21 contre 34% chez les enfants de la population générale (Hasle et al. 2016). Par ailleurs, une pré-leucémie appelée syndrome myéloprolifératif transitoire affecte jusqu'à 30 % des individus atteints du SD avant l'âge de 3 mois. Bien que le syndrome myéloprolifératif transitoire se résolve généralement spontanément durant les premiers mois de la vie, il semble augmenter la susceptibilité de développer une leucémie vers l'âge de 5 ans. Jusqu'à 30% des personnes atteintes du syndrome myéloprolifératif transitoire développeront une leucémie myéloïde du SD (Tunstall et al. 2018).

4.7 Maladie d'Alzheimer

Grâce aux nombreuses avancées médicales et au suivi paramédical régulier, la qualité de vie des personnes avec la T21 s'est sensiblement améliorée au cours des dernières décennies. En effet, l'espérance de vie des personnes atteintes du SD est passée de 9 ans en 1929 à environ 55 ans de nos jours et cette durée de vie continue d'augmenter (Bittles et Glasson 2007; Parizot et al. 2019). Vivant plus longtemps, les porteurs de T21 ont donc un risque accru de développer des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer. Ce risque peut notamment provenir de la présence de trois copies du gène codant pour la

protéine précurseur amyloïde (APP) localisée sur le Hsa21. En effet, la trisomie de ce gène est nécessaire et suffisante pour conduire au développement de la maladie d'Alzheimer (Rovelet-Lecrux et al. 2006; Doran et al. 2017). Les porteurs de T21 sont donc plus à risque de développer précocement une démence de type Alzheimer.

En effet, après l'âge de 40 ans la majorité des personnes atteintes du SD commencent à présenter des caractéristiques histopathologiques de la maladie d'Alzheimer : développement de plaques amyloïdes et d'enchevêtrements neurofibrillaires. Mais ces individus ne présentent généralement pas de déclin cognitif avant plusieurs années, (Wisniewski, Wisniewski, et Wen 1985; Wiseman et al. 2015) seules les personnes âgées atteintes du SD développeront une démence. L'estimation de l'âge moyen d'apparition de la pathologie est de 53.8 ans, l'âge de décès est de 58.4 ans et enfin la durée de vie est de 4.6 ans après diagnostic (Iulita et al. 2022).

V. Anomalies cérébrales

Les déficits cognitifs rapportés précédemment sont la conséquence de nombreuses anomalies cérébrales observées chez les individus atteints du SD. Ces anomalies affectent le cerveau au niveau morphologique, fonctionnel, cellulaire et aussi au niveau de la plasticité synaptique. Certaines de ces altérations sont décrites ci-dessous.

1. Atteintes de la structure et de la fonctionnalité cérébrale

L'analyse par imagerie par résonance magnétique a révélé une diminution globale de 20% du volume cérébral chez les individus atteints du SD par rapport au groupe contrôle (Hamner et al. 2018; Pinter et al. 2001). Par ailleurs, une analyse d'imagerie *in vivo* sur le cerveau en développement (foetal et néonatal) d'individus portant la T21 montre une réduction du volume cérébelleux à partir du deuxième trimestre et une altération de la croissance corticale à partir du troisième trimestre. Ces altérations développementales du cortex et du cervelet seraient à l'origine de troubles neurocognitifs durant la vie de l'individu (Patkee et al. 2020).

La diminution du volume cérébral observée dans le SD n'affecte que certaines sous-régions et en particulier les sous-régions du lobe frontal, du lobe temporal et de l'hippocampe (Hamner et al. 2018). De plus, il a aussi été noté qu'une hypoplasie cérébelleuse, c'est-à-dire une diminution du volume du cervelet, est présente dans le SD (Pinter et al. 2001). Le cervelet est un modulateur général qui régule, coordonne et optimise les fonctions motrices ainsi que les fonctions cognitives telles que l'attention, le langage et le contrôle émotionnel. Par conséquent, l'hypoplasie cérébelleuse a été suggérée comme un facteur de cause de l'hypotonie musculaire, des difficultés de coordination motrice et aussi des troubles de la parole articulatoire observés chez les enfants trisomiques (Frith et Frith 1974). L'altération du cervelet peut aussi influencer les fonctions non-motrices comme les fonctions exécutives et la mémoire verbale à court terme (Schmahmann et Sherman 1997). D'autre part, la diminution des lobes frontal et temporal dans le SD (Pinter et al. 2001) peut expliquer certains des déficits cognitifs observés. En effet, le lobe frontal est impliqué dans la planification, le raisonnement et l'attention alors que le lobe temporal régule l'acquisition du langage et la mémorisation. La réduction de la taille de l'hippocampe, qui joue un rôle central dans la mémoire, peut être associée au déficit de la mémoire explicite à long terme présente dans le SD (Aylward et al. 1999). Les sujets porteurs de T21 et atteints en surplus de démence présentent une diminution du volume de l'amygdale, structure impliquée dans la reconnaissance et la valence émotionnelle (Aylward et al. 1999).

Des liens entre les déficits du langage chez les porteurs du SD et l'activation des régions du cerveau en réponse à une tâche passive comme écouter une histoire ont été mis en évidence par IRM fonctionnelle (IRMf). Une activation bilatéralement diminuée du cortex auditif primaire et des gyri temporaux supérieurs et moyens – régions du cerveau impliquées dans l'audition et le langage – a été observée au cours d'une tâche d'écoute d'histoire passive (Jacola et al. 2014).

Contrairement à ces nombreuses modifications, certaines régions du cerveau ne semblent pas être impactées par le SD, notamment les ganglions de la base qui conservent un volume normal (Pinter et al. 2001). Leur rôle dans la mémoire procédurale explique que cette mémoire n'est pas impactée dans le SD.

2. Atteintes au niveau cellulaire

De nombreuses études mettent en évidence une réduction du nombre de cellules au niveau cérébral. Le nombre de neurones dans l'hippocampe est diminué chez des fœtus porteurs de T21 de 17 à 21 semaines de gestation et une augmentation de l'apoptose cellulaire est observée dans le gyrus denté et la zone ventriculaire (Guidi et al. 2008) mais également dans les couches II et IV du cortex chez les enfants avec SD (Wisniewski 1990). De plus, une réduction du nombre total de cellules dans la région néocorticale a été observée dans des cerveaux fœtaux humains porteurs de T21 âgés de 19 semaines de gestation (Larsen et al. 2008).

Chez des fœtus porteurs de T21, de 17 à 21 semaines de gestation, le nombre de cellules exprimant Ki-67, un marqueur des cellules en phases G1, S, G2 et M du cycle cellulaire, est réduit dans le gyrus denté et la matrice germinale du ventricule latérale. La diminution de la prolifération cellulaire dans le gyrus denté explique les défauts des mémoires dépendantes de l'hippocampe (Contestabile et al. 2007). Une réduction de la prolifération cellulaire dans la matrice germinale, qui contient les progéniteurs des cellules neuronales et gliales qui migreront ensuite vers les différentes couches corticales, explique la taille corticale réduite du cerveau des fœtus avec SD (Contestabile et al. 2007). De plus, une réduction significative de la glie radiale, progéniteurs neuronaux et gliaux, est observée avant 24 semaines de gestation dans le SD et cette altération peut contribuer à la réduction du volume des lobes frontaux (Baburamani et al. 2020).

S'ajoute à cela un retard de myélinisation dans la formation hippocampique avec une diminution de la densité des axones myélinisés dans le hile du gyrus denté des porteurs de T21 (Ábrahám et al. 2012; Wisniewski 1990). Les fibres myélinisées arrivant dans le hile proviennent principalement des noyaux septaux sous-corticaux et les connexions septo-hippocampiques participent à la formation de la mémoire (Amaral, Scharfman, et Lavenex 2007). Pour cette raison, le retard ou l'altération de la myélinisation dans le hile peut contribuer au déficit cognitif des individus avec le SD.

3. Atteintes de la plasticité synaptique

La plasticité synaptique est définie comme la capacité des synapses chimiques à adapter leur structure et fonction en réponse à l'activité du réseau. La plasticité synaptique permet ainsi de former et défaire des synapses et correspond au support de la mémoire et de l'apprentissage (Bliss et Collingridge 1993; Hofer et Bonhoeffer 2010). Les recherches mettent en évidence une corrélation entre l'altération de la fonction cognitive dans le SD et la perturbation de la plasticité synaptique qui permet l'acquisition, le stockage ainsi que le partage des informations par les circuits neuronaux (Cramer et Galdzicki 2012; Contestabile, Magara, et Cancedda 2017). L'altération de la plasticité synaptique dans le SD peut se situer au niveau morphologique et fonctionnel.

En effet, des études ont montré une dysgénésie dendritique et une diminution des ramifications dendritiques et de la formation des synapses chez les nourrissons porteurs de T21 (L. Becker et al. 1991). Chez un enfant porteur du SD de 19 mois d'âge, une analyse des études des épines dendritiques a été réalisée à la suite d'une coloration de Golgi du cortex cérébral. Une non-maturation et des anomalies de la morphologie des épines dendritiques s'accompagnant d'une réduction du nombre d'épines dendritiques ont été observées sur les neurones pyramidaux du cortex moteur (Marin-Padilla 1976). Ces anomalies contribuent à l'altération de la connectivité neuronale.

La densité dendritique et neuronale est altérée dans le tissu cérébral d'individus avec le SD. L'analyse de cortex fœtaux de porteurs de T21 (âgé de 19.5 semaines de gestation) a révélé une réduction du niveau de neurotransmetteurs. Les neurotransmetteurs diminués sont la sérotonine, la dopamine ainsi que l'acide γ -aminobutyrique (GABA). Ces neurotransmetteurs sont impliqués dans le développement cérébral et en particulier dans la migration neuronale, le guidage axonal et la formation des neurites (Ruediger et Bolz 2007; Whittle et al. 2007). Le mauvais développement des circuits de signalisation sérotoninergique, dopaminergique et GABA-ergique lors du développement fœtal contribuent à la formation d'un cerveau dysfonctionnel dans le SD. Par exemple, la signalisation altérée du neurotransmetteur GABA conduit à un déséquilibre de la balance synaptique excitation/inhibition, réduisant la plasticité synaptique ainsi que les fonctions d'apprentissage et de mémoire (Contestabile, Magara, et Cancedda 2017).

VI. Corrélation génotype-phénotype dans les trisomies 21 dues à des duplications segmentaires

Le Hsa21 est le plus petit autosome humain. Il est le deuxième chromosome humain séquencé entièrement après le chromosome 22 en l'an 2000. Le séquençage a montré que le Hsa21 est composé de 33.8 mégabases (Mb) d'acide désoxyribonucléique (ADN) sur le bras long (21q) et 0.2 Mb sur le bras court (21p). Le Hsa21 est l'un des chromosomes humains contenant le nombre le plus faible de gènes, avec seulement 225 gènes codants sur le 21q (Hattori et al. 2000).

L'objectif principal de la compréhension de la pathologie du SD a été de déterminer la corrélation génotype – phénotype en étudiant les individus porteurs de T21 partielles dans le but d'identifier les gènes et les mécanismes responsables des différents phénotypes observés et donc d'adapter de potentiels traitements thérapeutiques. Une région du Hsa21 localisée sur le 21q a été identifiée comme étant responsable de la majorité des phénotypes observés dans le SD et en particulier dans les déficits cognitifs (Delabar et al. 1993). La région a été nommée la « *Down Syndrome chromosomal Region* » (DCR). Cette région qui s'étend sur 2.4 Mb en 21q22.2, contient les gènes localisés entre *CBR1*, « *Carbonyl Reductase 1* » et *ERG*, « *ETS-related gene* ». Pour arriver à cette conclusion, l'équipe du Dr. Sinet (Delabar et al. 1993) a étudié 10 porteurs de T21 présentant des trisomies partielles qui chevauchaient toute la DCR. Par la suite, d'autres équipes se sont intéressées à la cartographie d'une carte phénotypique, mais en étudiant des cas de T21 partielles n'incluant pas forcément la DCR. L'analyse de lignées cellulaires provenant de 16 individus porteurs de T21 partielles a mis en évidence que les régions impliquées dans les phénotypes observés ne sont pas limitées à la DCR (Korenberg et al. 1994). En effet, trois individus avec des trisomies partielles n'incluant pas la DCR présentent les caractéristiques typiques du SD. Ces résultats démontrent que les gènes localisés dans la DCR ne sont pas les seuls responsables des pathologies du SD et vont à l'encontre de l'hypothèse d'une unique région responsable des phénotypes observés comme mis en évidence précédemment (Delabar et al. 1993).

Par la suite, les équipes ont cartographié plus précisément les régions impliquées dans les différents phénotypes observés et cela avec des techniques plus performantes notamment avec la « *Comparative genomic hybridization array* ». Comme son nom l'indique, cette

technique compare de manière précise les séquences du génome de plusieurs individus. Grâce à cette technologie, les équipes du Dr. Korbelt et Dr. Antonarakis ont mis en évidence des régions associées aux déficits cognitifs ou encore à l'hypotonie musculaire (Lyle et al. 2009; Korbelt et al. 2009). L'équipe du Dr. Antonarakis montre que deux régions sont impliquées dans la déficience intellectuelle du SD, l'une comprise entre 37.94 Mb et 38.64 Mb comprenant les gènes « *Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 6* » (KCNJ6), « *Down Syndrome Critical Region 4* » (DSCR4) et « *Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 15* » (KCNJ15) et l'autre comprenant la région du centromère à 26.96 Mb (Lyle et al. 2009). L'équipe du Dr. Korbelt met en évidence qu'il existe plusieurs régions critiques de la déficience intellectuelle dans le SD et plaide contre un rôle essentiel de l'APP dans ce phénotype (Korbelt et al. 2009). De plus, leurs résultats vont à l'encontre de l'hypothèse – émise en 2006 à partir d'études réalisées chez des modèles souris – selon laquelle les gènes DSCR1 et DYRK1A (*Dual-specificity Tyrosine-Phosphorylated Kinase 1A*) forment une région critique responsable de la majorité des caractéristiques du SD, bien que les deux puissent y contribuer séparément (Korbelt et al. 2009; Arron et al. 2006). Les résultats de l'équipe du Dr. Korbelt de 2006 confirment à nouveau l'absence de DCR, c'est-à-dire l'absence d'une région unique du Hsa21 responsable de tous les phénotypes – ou des plus sévères – du SD.

Une étude génomique chez 8 personnes atteintes de T21 partielles a mis en évidence le rôle de la protéine « *Down Syndrome Cell Adhesion Molecule* » (DSCAM) dans l'apparition des anomalies cardiaques congénitales (Barlow et al. 2001). Une autre étude réalisée sur 107 personnes porteurs de T21 présentant ou non une cardiopathie congénitale a permis quant à elle de révéler une région impliquée dans les anomalies cardiaques du SD, région localisée sur 21q22.2 (longueur de 0.96 Mb). Cette région contient le gène DSCAM déjà validé pour cette pathologie, mais aussi les gènes de la « *Beta Secretase 2* » ainsi que du « *Placenta Enriched 4* » (Pelleri et al. 2017).

Une réanalyse de tous les cas décrits de T21 partielles de 1973 à 2015 souligne la présence d'une région critique très restreinte, la HR-DSCR (en anglais, « *Highly Restricted Down Syndrome Critical Region* »), comme la région minimale dont la duplication est présente chez tous les sujets atteints du SD étudiés et absente chez les sujets non atteints (Pelleri et al. 2016). Cette région de seulement 34 kb située sur la partie distale 21q22.13 entre les gènes *KCNJ6* et *DSCR4* serait impliquée dans deux des phénotypes du SD : la déficience intellectuelle et un

faciès typique du SD (Pelleri et al. 2019). En effet, l'analyse a été réalisée en considérant la présence ou l'absence de SD dans le cas de phénotypes de déficience intellectuelle et de dysmorphies faciales.

Identifier précisément les gènes impliqués dans les différents symptômes et comorbidités du SD avec les études sur les T21 partielles sur l'homme est trop restrictif. En effet, le nombre d'individus atteints de trisomies partielles correspond à une proportion très faible dans le monde. C'est pourquoi l'utilisation de modèles animaux est une nécessité pour l'analyse de la corrélation génotype-phénotype du SD.

VII. Modèles rongeurs du syndrome de Down

1. Les modèles souris

Les souris correspondent au modèle animal le plus couramment utilisé pour étudier la physiopathologie des maladies humaines. En effet, les souris sont biologiquement très proches des humains : 90% des régions du génome humain et murin ont une synténie comparable (Mouse Genome Sequencing Consortium 2002). Les gènes orthologues au Hsa21 sont retrouvés de manière synténique sur trois différents chromosomes chez la souris (Mmu) : Mmu10, Mmu16 et Mmu17 (**Figure 8**). La majorité des gènes du Hsa21 sont localisés sur le Mmu16 (102 gènes) entre *Lipi* (« *Lipase I* ») et *Zbtb21* (« *Zinc finger and BTB domain containing 21* ») dont le gène *Dyrk1a* (« *Dual-Specificity Tyrosine Phosphorylation-Regulated Kinase 1A* ». Les autres sont sur le Mmu17 (19 gènes) entre *Abcg1* (« *ATP-binding cassette sub-family G member 1* ») et *Rrp1b* (« *ribosomal RNA processing 1 homolog B* ») et sur le Mmu10 (37 gènes) entre *Pdxk* (« *Pyridoxal kinase* ») et *Prmt2* (« *Protein Arginine Methyltransferase 2* ») (Gupta, Dhanasekaran, et Gardiner 2016). Au cours des années de recherches, de nombreux modèles souris du SD ont été construits pour mieux comprendre la physiopathologie du SD et identifier la corrélation génotype-phénotype dans le but ultime de déterminer des gènes cibles de thérapies du SD (Herault et al. 2017). Les modèles murins générés présentent des trisomies partielles avec différentes régions synténiques au Hsa21 dupliquées. Certains modèles souris ont été générés par traitement radioactif (Ts(17¹⁶)65Dn et Ts1Cje), par manipulation nucléaire (Tc1), ou encore par réarrangement chromosomique avec le système Cre-*loxP* (Ts1Yah et Dp(16*Lipi-Zbtb21*)1Yey). De nombreux autres modèles souris du SD ont été générés, mais dans

le paragraphe suivant, seul un modèle par type de construction est développé, le modèle Ts(17¹⁶)65Dn noté ci-après Ts65Dn, le modèle Tc1, et le modèle Dp(16*Lipi-Zbtb21*)1Yey nommé Dp1Yey (Figure 8).

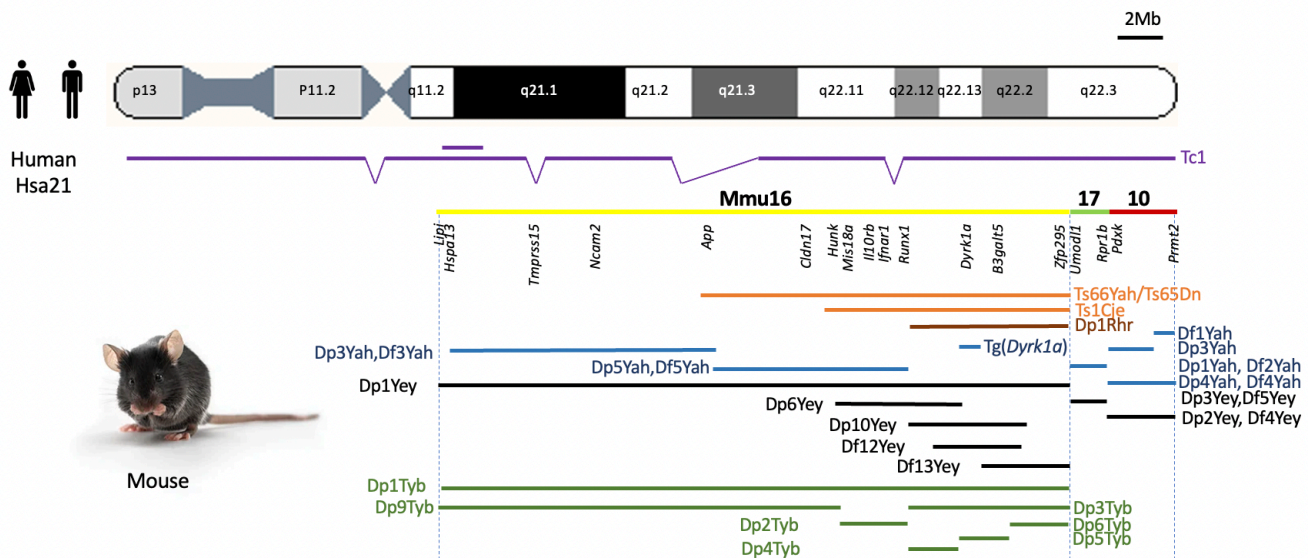


Figure 8: Les modèles souris du SD.

1.1 Le modèle Ts65Dn

Le modèle Ts65Dn, a été généré suite à une translocation réciproque : fixation de l'extrémité télomérique du chromosome Mmu16 au centromère du Mmu17 (Reeves et al. 1995). Ce modèle présente une trisomie de 132 gènes de la partie distale du chromosome Mmu16 et de la région centromérique du Mmu17. Concernant la structure cérébrale de ce modèle, il présente une réduction du volume du cervelet comme rapporté dans le SD (Baxter 2000). De plus, les études sur ce modèle ont montré un retard de croissance (poids et taille des animaux), une hypotonie musculaire, des anomalies crânio-faciales et cardiovasculaires (Reeves et al. 1995; Moore 2006). D'autre part, l'analyse comportementale des souris Ts65Dn révèle des déficits cognitifs dans l'apprentissage et la mémorisation spatiale ainsi qu'une altération de la mémoire de reconnaissance (Goodliffe et al. 2016; Olmos-Serrano et al. 2016; De la Torre et al. 2014). Au niveau cellulaire et synaptique, les souris Ts65Dn ont également une réduction du nombre de cellules granulaires du gyrus denté et des épines dendritiques. En plus de ces diminutions, des altérations de la morphologie des épines dendritiques et des boutons terminaux ont été observées dans l'aire CA1 de l'hippocampe et les couches II et III du cortex moteur ainsi que du cortex somatosensoriel (Belichenko et al. 2004).

Pendant de nombreuses années, le modèle Ts65Dn a été le plus utilisé par les différentes équipes afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents des phénotypes observés ainsi que pour l'étude de traitement thérapeutique de la T21. Cependant, la translocation réciproque utilisée pour la création du modèle introduit une aneuploïdie supplémentaire dans ce modèle. En effet, la région du Mmu17 présente sur le minichromosome libre avec un total de 60 gènes allant de *Psid-ps2/Scaf8* à *Pde10a* ne correspond pas à une région synténique au Hsa21 (Duchon et al. 2011; Reinholdt et al. 2011). De ce fait, les altérations comportementales retrouvées chez les souris Ts65Dn sont une conséquence de trois potentiels facteurs génétiques : le surdosage des gènes homologues au Hsa21, la présence du minichromosome ou encore la trisomie des gènes de la région centromérique du Mmu17 non homologues au Hsa21. Par exemple, les gènes trisomiques dans le modèle Ts65Dn et non orthologues au Hsa21 tels que *Tiam2* (« *T lymphoma invasion and metastasis inducing gene 2* ») et *Synj2* (« *Synaptojanin2* ») pourraient accroître les conséquences du surdosage de leurs paralogues respectifs Tim1 et Synj1 sur les phénotypes observés (Duchon et al. 2021; Voronov et al. 2008; C.-K. Chen et al. 2014). Récemment l'équipe du Dr. Yann Héroult a étudié un nouveau modèle de souris du SD, généré par CRISPR/Cas9 afin de supprimer la trisomie de la région génomique non synténique au Hsa21 (Duchon et al., s. d.). Ce modèle noté Ts66Yah, présente une perte de certains phénotypes par rapport au modèle Ts65Dn, dont l'hyperactivité et le déficit d'apprentissage spatial, tout en reproduisant des déficits liés au SD comme une altération de la mémoire de reconnaissance. Ces résultats démontrent que la trisomie de la région centromérique du Mmu17 non synténique au Hsa21 dans le modèle Ts65Dn conduit à des phénotypes non liés au surdosage des gènes synténiques au Hsa21. Contrairement aux souris Ts65Dn, le modèle Ts66Yah est donc un meilleur modèle pour évaluer les conséquences spécifiques du surdosage génétique dans le SD.

Dans le modèle Ts65Dn, la trisomie des gènes non homologues au Hsa21 peuvent influencer les résultats d'une étude de traitement potentiel du SD. Par conséquent, ce modèle n'est pas adapté à ce type d'étude et ne sera donc pas utilisé au cours de ce projet. La validation et la caractérisation du modèle Ts66Yah n'ayant pas été finalisées lorsque les études de ce projet de thèse ont débuté, ce modèle n'a également pas pu être utilisé.

1.2 Le modèle Tc1

Le modèle Tc1 est un modèle chimérique souris/humain. Ce modèle de souris trans-chromosomique a été généré par transfert de chromosome (O'Doherty et al. 2005). Ce transfert a été effectué par des microcellules d'irradiation de rayons X dans des cellules souches embryonnaires permettant une copie ségrégative libre du Hsa21. Au niveau cognitif, un défaut de mémoire visuelle en test de reconnaissance d'objet, une altération de la mémoire de travail spatiale dans le test du labyrinthe de Morris et un déficit de la mémoire olfactive sont observés (O'Doherty et al. 2005; Morice et al. 2008; Hall et al. 2016). Cependant, ce modèle ne présente pas de déficit de mémoire à court terme pour les informations de localisation d'objet (Hall et al. 2016). La plasticité synaptique des souris Tc1 est affectée avec une altération de la potentialisation à long terme (LTP) dans l'hippocampe (Morice et al. 2008). Une diminution de l'expression à la surface membranaire de la sous-unité GluR1 (« *Glutamate Receptor 1* ») du récepteur AMPA (acide β -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-propionique) est également observée dans l'hippocampe de ce modèle, soulignant l'altération de la LTP (Morice et al. 2008). De plus, l'analyse par IRM des cerveaux de souris Tc1 a mis en évidence une augmentation inattendue du volume intracrânien ainsi que des réductions locales de volume et de densité de matière grise, principalement dans le cervelet (Powell et al. 2016). Ces résultats sont en accord avec le SD humain, dont l'hypoplasie cérébelleuse est impliquée dans les difficultés motrices et d'élocution (Pinter et al. 2001).

Même si ce modèle reprend les phénotypes les plus importants du SD, certains phénotypes ne sont que partiellement présents et ceci peut s'expliquer par la présence d'une délétion : six duplications et plus de 25 réarrangements structurels *de novo* qui proviennent de l'effet des rayonnements gamma sur un chromosome humain entier (Gribble et al. 2013). D'après ces résultats, le modèle Tc1 présente une trisomie partielle. Cependant, la distribution du chromosome humain dans les cellules de ce modèle est mosaïque, certaines cellules portent le Hsa21 surnuméraire tandis que d'autres non. Pour ces raisons, le modèle Tc1 ne sera pas utilisé dans ce projet.

1.3 Le modèle souris Dp1Yey

Le modèle souris Dp1Yey, présente une duplication de 22.9 Mb couvrant toute la région de synténie entre le chromosome Hsa21 et le chromosome Mmu16 (Li et al. 2007). Cette trisomie a été réalisée avec le système d'ingénierie chromosomique *Cre-loxP*. Ce modèle contient 113 gènes orthologues au Hsa21. Au niveau des phénotypes, ce modèle présente des similitudes avec les altérations observées chez les porteurs du SD. En effet, les embryons Dp1Yey de 18,5 jours ont des malformations cardiaques et gastro-intestinales dans 37% des cas (Li et al. 2007). Durant la période postnatale, une brachycéphalie et une réduction de la taille osseuse de la mâchoire ont été rapportées. De plus, la taille du cervelet et le nombre de cellules granulaires sont diminués (Starbuck et al. 2014). Ce modèle présente un retard des capacités d'apprentissage, un déficit de la mémoire spatiale, une altération de la mémoire associée au contexte, mais aussi une altération de la mémoire de travail (Yu et al. 2010; Duchon et al. 2021). Enfin, les souris Dp1Yey présentent également des défauts de plasticité synaptique avec une diminution de la LTP (Yu et al. 2010).

2. Les modèles rats

Du fait de la similitude génétique et physiologique entre l'homme et la souris et de la disponibilité de techniques de manipulation génétique, les chercheurs ont utilisé les souris comme modèle animal durant de nombreuses années. Ces modèles ont apporté des éléments clés pour mieux comprendre la génétique et la physiopathologie du SD. Toutefois, les technologies de manipulation génétique ont progressé durant les dernières années permettant maintenant de générer et d'étudier les pathologies et les syndromes humains tel que le SD chez le rat (Ellenbroek et Youn 2016). Il faut également noter qu'un modèle rat du SD permet de mieux explorer le comportement, la cognition, la mémoire et les interactions sociales. Socialement plus actif, les rats sont généralement plus compétents et moins stressés par les tests cognitifs tel que le labyrinthe de Morris (Ellenbroek et Youn 2016).

Un modèle animal optimal du SD devrait reproduire une majorité des phénotypes observés dans ce syndrome, avoir le plus possible de gènes trisomiques homologues au Hsa21 et ne pas présenter de trisomies de gènes non homologues au Hsa21. Les éléments génétiques équivalents au Hsa21 sont répartis sur trois chromosomes différents chez la souris, ce qui rend

la génération d'un modèle murin de T21 complète, complexe à obtenir (Stylianos E. Antonarakis et al. 2004) . Chez le rat (« *Rattus norvegicus* », Rno), les gènes du chromosome Hsa21 se retrouvent sur deux chromosomes seulement : le Rno11 et le Rno20. Sur le Rno11, la région synténique au chromosome Hsa21 fait une taille de 24.4 Mb, contient 140 gènes et se situe entre les gènes *Lipi* et *Zbtb21* (correspondant à la région d'homologie portée par le Mmu16). Le chromosome Rno20 contient un plus petit fragment synténique au Hsa21, avec un total de 73 gènes situés entre *Umodl1* (« *Uromodulin Like 1 precursor* ») et *Prmt2* (correspondant aux régions d'homologies portées par les Mmu17 et Mmu10).

2.1 Le modèle de rat trans-chromosomique

Le modèle rat trans-chromosomique est noté TcHsa21. Il contient le Hsa21 à ségrégation libre. La stratégie utilisée pour la création de ce modèle est le système de clonage de gènes de la taille d'une mégabase avec le vecteur MAC1 (« *Mouse Artificial Chromosome 1* »). Ce système permet de générer des rats humanisés avec des groupes de gènes de la taille d'une Mb en combinant le transfert de chromosome à l'aide de technologie de vecteur chromosomique et d'édition du génome de souris (Kazuki et al. 2019). Le Hsa21 a été inséré sous le contrôle du promoteur EGFP (« *Enhanced Green Fluorescent Protein* ») permettant ainsi le marquage des cellules trisomiques (Kazuki et al. 2022). Le marquage des cellules sanguines périphériques a été analysée par cytométrie en flux et indique que 81% des cellules des rats présentent le Hsa21. Au niveau comportemental, ces animaux présentent des déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale dans le test du labyrinthe de Morris. De plus, une augmentation de l'anxiété et une hyperactivité est observée chez les rats TcHsa21. Le volume cérébral est plus petit et ces animaux présentent une taille cérébelleuse réduite. Comme dans le SD, la morphologie crâniofaciale et le développement cardiaque des rats TcHsa21 sont altérés (Kazuki et al. 2022).

2.2 Modèles rats générés avec la technologie CRISMERE

Les modèles rats du SD présentés ci-dessous ont été générés avec la technologie CRISMERE basé sur la stratégie CRISPR/Cas9, à l'Institut Clinique de la Souris, Illkirch, France (Birling et al. 2017). Ces modèles sont les Dup(Rno11), les Dup(Rno20) et le Dup(Rno11-20), obtenu par croisement des modèles Dup(Rno11), les Dup(Rno20) ensembles (**Figure 9**). Les modèles Dup(Rno11) et Dup(Rno20) présentent une duplication de la région du chromosome Hsa21

synténique respectivement aux chromosomes Rno11 et Rno20. Chacun de ces deux modèles ont donc une T21 partielle alors que les rats Dup(Rno11-20) ont une T21 complète. La caractérisation comportementale de ces animaux a été réalisée au sein de l'équipe du Dr. Yann Héroult mais les données ne sont pas encore publiées. Les rats mâles Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) présentent une réduction de leur masse corporelle respectivement de 13,1% et 21,9%. Au niveau cognitif, les rats mâles des trois modèles, Dup(Rno11), Dup(Rno20) et Dup(Rno11-20), ont une altération de la mémoire spatiale à court terme. De plus, les modèles Dup(Rno11) et Dup(Rno11-20) ont un déficit de l'apprentissage spatial à long terme dans le test du labyrinthe de Morris.

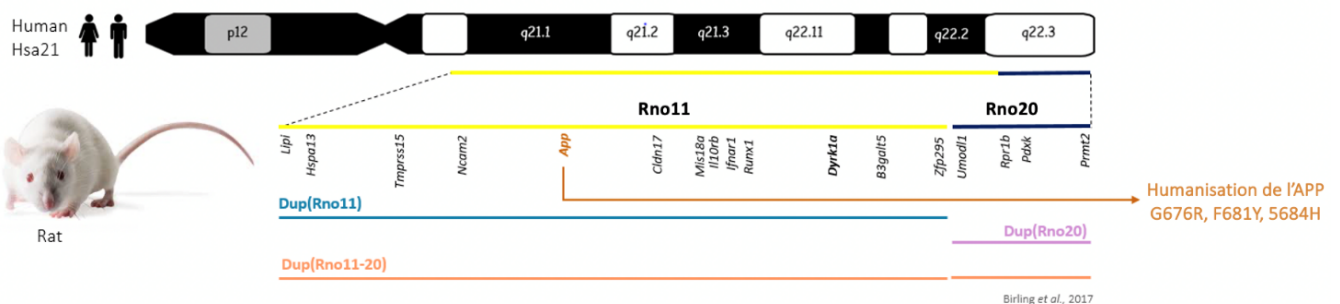


Figure 9 : Représentation des régions chromosomiques chez la souris et le rat synténiques au Hsa21.

La supérieure de la figure représente le Hsa21. La partie inférieure correspond aux régions chromosomiques du rat synténiques au Hsa21 avec la région Rno11 en jaune et Rno20 en bleu foncé. Les intervalles dupliqués chez les modèles rat Dup(Rno11), Dup(Rno20) et Dup(Rno11-20) sont respectivement représentés en bleu, rose et orange. L'humanisation du gène de l'App est indiquée par la flèche verte marron.

Le risque de développer la maladie d'Alzheimer chez les individus atteints du SD est de 23% à l'âge de 50 ans et ce risque augmente avec l'âge pour atteindre 88% à partir de 65 ans (McCarron et al. 2017). De plus, le gène de l'APP qui joue un rôle clé dans l'apparition de la maladie d'Alzheimer est localisé sur le Hsa21. La duplication de l'App suffit pour induire l'apparition de cette pathologie telle qu'elle peut être observée chez les individus avec trisomies partielles du Hsa21 (Hooli et al. 2012). Par conséquent, afin de se rapprocher au plus près du SD chez l'homme, l'équipe du Dr. Yann Héroult a généré des modèles du SD dans le

cadre de la maladie d'Alzheimer en modifiant le gène *App* du rat dans le but de l'humaniser. En effet, le gène *App* du rat ne développe pas spontanément les plaques amyloïdes, caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. Pour cela, 3 acides aminés de la séquence du peptide β -amyloïde ($A\beta$), produit du clivage de l'APP par la β -sécrétase (Haass et al. 2012; De Strooper et al. 1995), ont été modifiés par mutation ponctuelle (**Figure 10**). Les modèles générés sont notés : Dup(Rno11)-App^{H3}, Dup(Rno20)-App^{H2} et le modèle complet du SD, le Dup(Rno11-20)-App^{H3}. La caractérisation phénotypique de ces animaux n'a pas été publiée. La **Table 1** synthétise les résultats comportementaux obtenus.

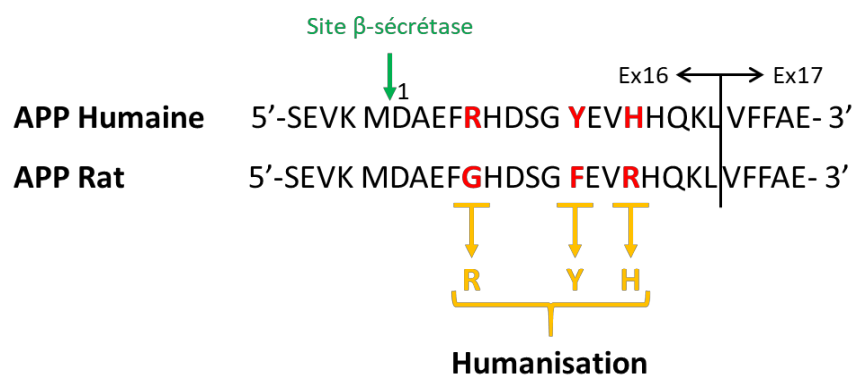


Figure 10 : Séquence peptidique de l' $A\beta$ chez l'Homme et chez le rat.

Représentation de la séquence peptidique de l'APP des acides aminés 667 à 695 situés à la fin de l'exon 16 (Ex16) et début de l'exon 17 (Ex17). 1, correspond au premier acide aminé de la séquence de l' $A\beta$. En rouge, différences entre la séquence humaine et celle du rat. En vert, site de clivage de la β -sécrétase. *Issue de la thèse du Dr. Marion Pellen, 2021.*

		Dup(Rno20)-APP ^{H2}		Dup(Rno11)-APP ^{H3}		Dup(Rno11-20)-APP ^{H3}	
		Mâles	Femelles	Mâles	Femelles	Mâles	Femelles
Masse Corporelle		≠		↘ (16,6%)	≠	≠	↘ (9,8%)
Activité circadienne		≠		≠	↘ activité nocturne	≠	↘ activité nocturne
Labyrinthe en Y	Anxiété	≠		≠		≠	
	Activité	≠		≠	↗	≠	↗
	Alternance	≠		≠		≠	↘
Champ ouvert	Activité	≠		≠	↗	≠	
	Anxiété	≠		≠		≠	
OLM		?	≠	?	≠	?	↘
NOR		≠	↘	≠		≠	
Piscine de Morris	Acquisition	≠		↘		↘	
	Rappel n°1	≠		↘		↘	
	Reversal	≠		↘		↘	
	Rappel n°2	≠		≠		≠	

Table 1 : Résultats de l'étude comportementale des modèles rats du SD avec l'humanisation de l'App.

L'orientation des flèches indique une diminution ou une augmentation par rapport aux animaux contrôles, les APP^{H2}. Les ? indiquent l'impossibilité d'émettre une conclusion. OLM correspond au test de la reconnaissance de la position de l'objet anglais « *Object location memory* » et NOR correspond au test de reconnaissance du nouvel objet en anglais « *Novel object recognition* ».

Issue de la thèse du Dr. Marion Pellen, 2021.

Chapitre 2 : DYRK1A, une cible thérapeutique

I. Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A : DYRK1A

1. Le gène DYRK1A

Le gène *DYRK1A* codant pour la sérine/thréonine kinase à double spécificité, est localisé sur le bras long du Hsa21 en 21q22.13 et s'étend sur environ 150 kb. Actuellement, 23 transcrits issus d'épissages alternatifs sont rapportés. Un total de 71 orthologues à DYRK1A ont été identifiés. Chez la souris, *Dyrk1a* est localisé sur le chromosome Mmu16 en 16qC4 et chez le rat, il est situé sur le Rno11 en 11q11 (données issues de Ensembl). Chez l'homme, il existe huit paralogues de *DYRK1A* dont quatre issus de la famille DYRK (« *Dual-specificity tyrosine-regulated kinase* »), à savoir *DYRK1B*, *DYRK2*, *DYRK3* et *DYRK4* et quatre de la famille des *HIPK* (« *Homeodomain-Interacting Protein Kinase* », *HIPK1*, *HIPK2*, *HIPK3* et *HIPK4*).

2. La protéine DYRK1A

Le gène *DYRK1A* code pour la protéine kinase DYRK1A. Cette protéine existe sous deux principaux isoformes de 763 et 754 acides aminés (Aranda, Laguna, et Luna 2011). Aucune différence fonctionnelle entre les deux isoformes n'a été rapportée. DYRK1A appartient à la famille des DYRK comprenant aussi DYRK1B, DYRK2, DYRK3 et DYRK4. Cette famille de kinase appartient au groupe CMGC qui inclut également les « *cyclin-dependant kinases* » (CDK), les « *mitogen-activated protein kinases* » (MAP kinases), les « *glycogen synthase kinases* » (GSK) ainsi que les « *Ccd2-like kinases* » (CLK) (**Figure 11**).

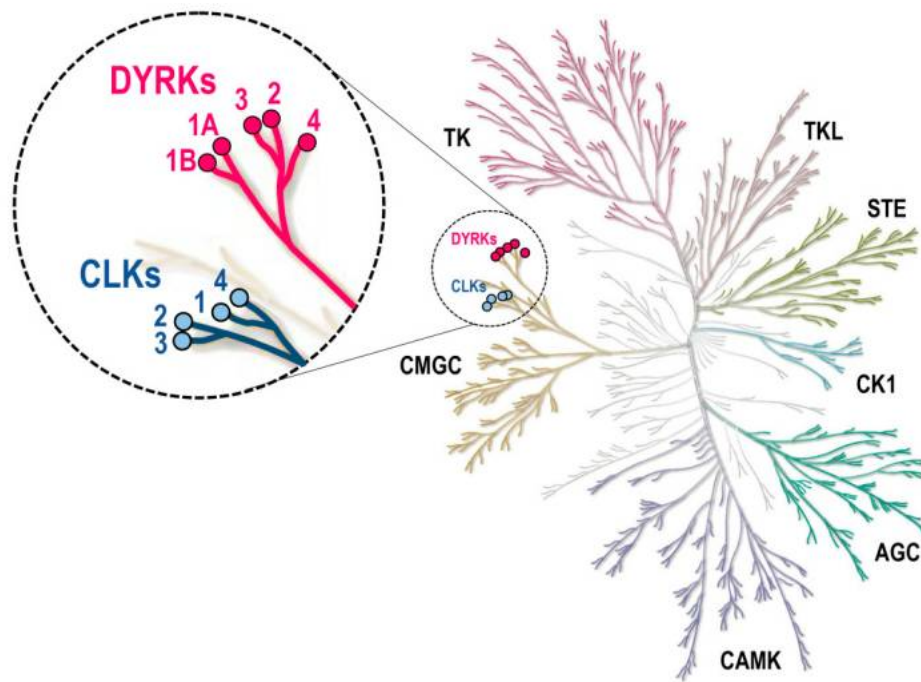


Figure 11 : Arbre phylogénétique des classes de kinases CMGC avec un zoom sur la famille des kinases DYRK et CLK.

Les membres des familles de kinases DYRK et CLK sont respectivement représentées en rose et bleu. Issue de Lindberg et Meijer, 2021.

2.1 Structure

Toutes les protéines de la famille DYRK conservent un domaine catalytique flanqué d'extensions N-terminale et C-terminale et une séquence caractéristique de la famille en N-terminale, la séquence DH (« *DYRK Homology-box* ») (**Figure 12 et 13**) (Widowati, Bamberg-Lemper, et Becker 2018). La séquence DH contribue à l'autophosphorylation d'une tyrosine conservée dans le domaine kinase (Tyr321 dans DYRK1A) au cours de la maturation de la kinase (Himpel et al. 2001; Soundararajan et al. 2013). L'autophosphorylation du résidu de tyrosine est en amont d'un résidu de proline par la prolyl-hydroxylase, dont l'hydroxylation est nécessaire pour l'activation de la kinase (S. B. Lee et al. 2020). À l'exception de DYRK3, toutes les autres DYRK possèdent un domaine de signal de localisation nucléaire (NLS) (C. Chang et Hsia 2021). De plus, DYRK1A et DYRK1B ont en commun un motif riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine (motif PEST) au niveau C-terminal permettant leur dégradation rapide (Rechsteiner et Rogers 1996). Les autres DYRK partagent un domaine accessoire

d'autophosphorylation N-terminal conservé, le domaine NAPA qui leur apporte une fonction de chaperon nécessaire à l'autophosphorylation de leur résidu de tyrosine localisé dans la boucle d'activation (Kinstrie et al. 2010). Le domaine NAPA est absent de la structure de DYRK1A et DYRK1B car leur autophosphorylation est une capacité intrinsèque à leur domaine kinase et par conséquent ne dépend pas de la présence de protéines chaperons (Lindberg et Meijer 2021). Par rapport aux membres de la famille DYRK, DYRK1A présente un second domaine NLS dans son domaine kinase et une séquence poly-histidine (His) composée de 13 résidus histidines consécutifs en C-terminale. La séquence riche en poly-histidine permet l'adressage vers les compartiments nucléaires d'épissage de DYRK1A (Salichs et al. 2009).

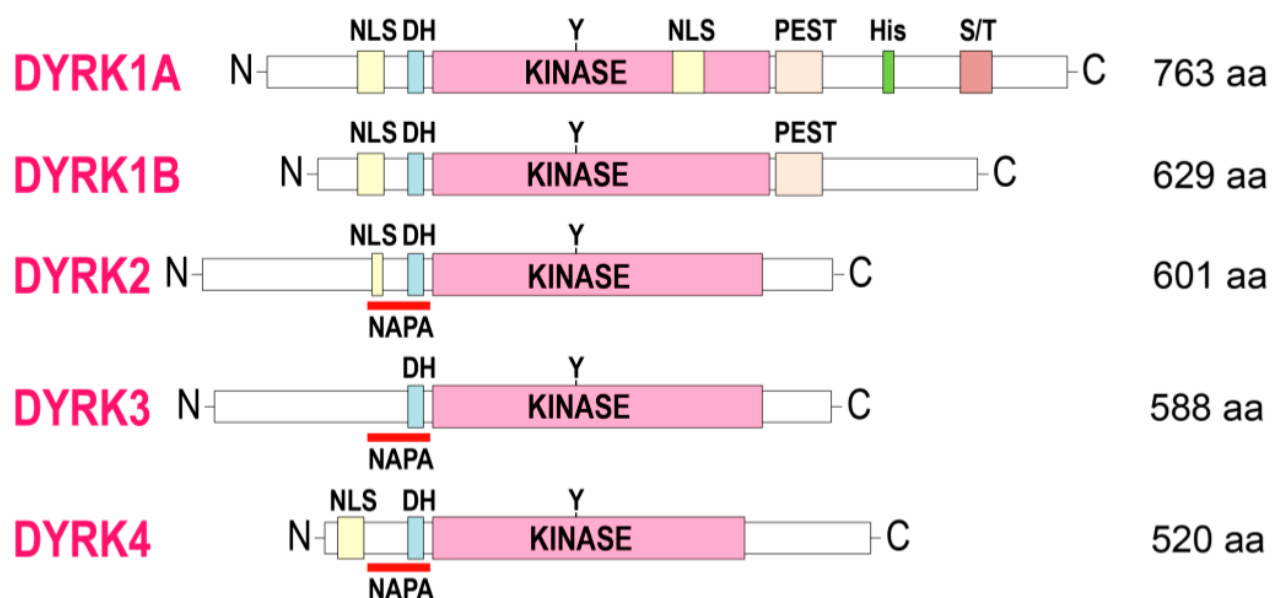


Figure 12 : Schématisation de la structure des cinq protéines de la famille DYRK.

NLS, signal de localisation nucléaire ; DH, DYRK-Homology box ; NAPA, région nécessaire à l'autophosphorylation située en N-terminale ; Kinase, domaine kinase ; PEST, motif riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine ; His, séquence poly-histidine ; S/T, région enrichie en résidus sérine et thréonine. Issue de Lindberg et Meijer, 2021.

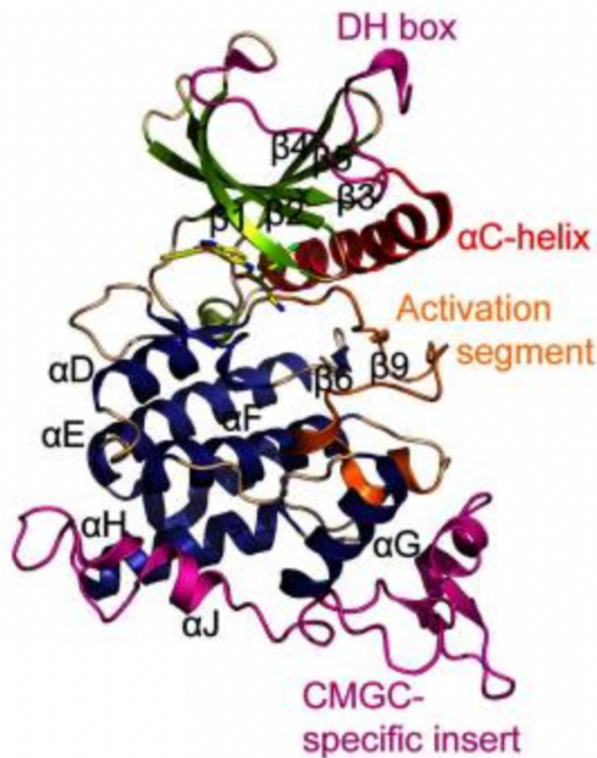


Figure 13 : Structure de cristalline de DYRK1A

Structure du domaine kinase de DYRK1A et de la boîte d'homologie DYRK, noté DH en N-terminale. La boîte DH et l'encart spécifique au CMGC sont affichés en magenta et le segment représentant la boucle d'activation, en orange. *Issue de Soundararajan et al., 2013.*

2.2 Expression

L'expression de DYRK1A est décrite comme ubiquitaire chez l'homme (**Figure 14**). Au niveau du cerveau, DYRK1A est détectée notamment dans le cortex cérébral, le cervelet, les bulbes olfactifs, la formation hippocampique ou encore dans le thalamus. Au niveau cellulaire, sa localisation est à la fois cytoplasmique et nucléaire (Wegiel et al. 2004). Chez l'homme adulte, la quantité de DYRK1A dans les régions frontales, temporales et occipitales est similaire. Cependant, dans le SD, le taux de DYRK1A au niveau du cortex frontal, temporal, occipital et cérébelleux est augmenté par rapport aux structures des contrôles (Dowjat et al. 2007). Chez les souris modèles du SD, les taux cérébraux de DYRK1A sont multipliés par environ 1.5, mettant en évidence que l'expression de cette protéine est dépendante de la dose du gène. Chez la souris adulte, DYRK1A est fortement exprimée dans le bulbe olfactif, le cortex entorhinal,

l'hippocampe, le cortex cérébelleux et dans la substance grise. Au niveau cellulaire et subcellulaire, DYRK1A est localisée dans le noyau ainsi que dans le cytoplasme des neurones et des astrocytes (Martí et al. 2003). Chez le rat, DYRK1A est abondamment exprimée au cours du développement embryonnaire dans le cortex cérébral, l'hippocampe, l'hypothalamus, le mésencéphale ainsi que la moelle épinière. A l'âge adulte, le rat présente un taux de DYRK1A stable et ubiquitaire dans les différents organes : le cerveau, le cœur, le foie, les reins et les poumons (Okui et al. 1999).

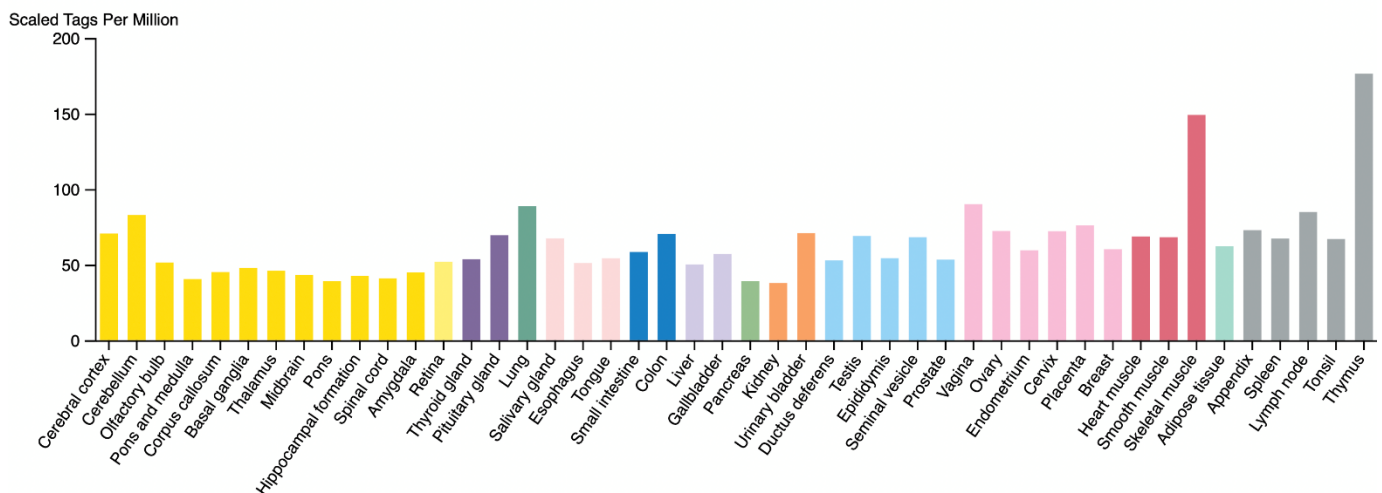


Figure 14 : Expression tissulaire de DYRK1A chez l'homme.

Issues du projet FANTOM5, « The human protein Atlas ».

2.3 Activation

Les protéines de la famille DYRK sont capables de phosphoryler des résidus de tyrosine (Tyr), sérine et thréonine. La phosphorylation des tyrosines est réservée à l'autophosphorylation (Figure 15). En effet, la phosphorylation/déphosphorylation d'un résidu de tyrosine conservé permet la régulation de l'activation de ces kinases. Pour DYRK1A, c'est la Tyr312 (isoforme de 754 acides aminés) ou encore la Tyr321 (isoforme de 763 acides aminés). Les résidus de tyrosine sont localisés dans la boucle d'activation pour permettre la stabilisation de la conformation de la kinase. Lorsque la kinase adopte cette conformation dite « active », le site d'interaction avec le substrat est bien positionné et devient alors accessible à la phosphorylation. La kinase est alors dite « mature » et peut phosphoryler les résidus de sérine (Ser) et de thréonine (Thr) (Himpel et al. 2001).

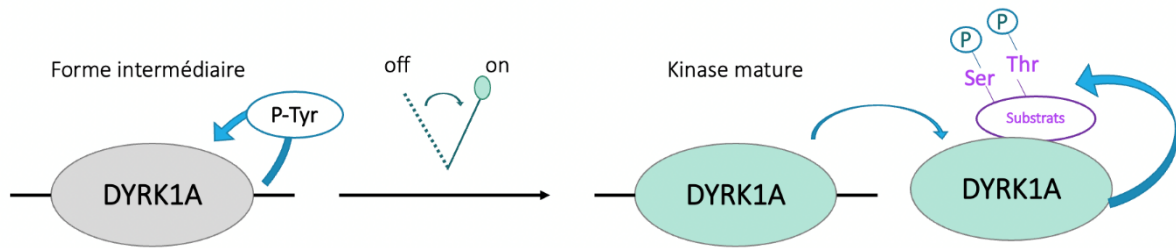


Figure 15 : Mécanisme d'activation de DYRK1A.

Lorsque DYRK1A est dans une forme dite « intermédiaire », l'autophosphorylation de la Tyr (P-Tyr) localisée dans la boucle d'activation permet un changement conformationnel du domaine catalytique. La forme de DYRK1A devient alors « mature » et peut phosphoryler les substrats sur des résidus de Ser et de Thr.

II. Phénotypes associés au dosage du gène *Dyrk1a*

L'apparition des phénotypes associés au SD est dépendante du dosage des gènes localisés sur le chromosome Hsa21 tel que le gène *Dyrk1a*. Le rôle crucial de DYRK1A dans la neurogénèse et la régulation des fonctions cognitives a été démontré à de nombreuses reprises.

Chez la drosophile, le gène minibrain (*mbn*) codant une protéine kinase à Ser/Thr, est l'homologue du gène *Dyrk1a*. La mutation de *mbn* conduit à une diminution de la production des cellules neuroblastiques ayant pour conséquence une réduction de la taille des lobes optiques et des hémisphères cérébraux (Tejedor et al. 1995). L'importance du gène DYRK1A est renforcée par l'observation chez des modèles de souris hétérozygotes pour *Dyrk1a* (*Dyrk1a*^{+/-}) d'une diminution de la taille du cerveau de 30% par rapport aux souris contrôles ainsi que des déficits cognitifs de leur mémoire de reconnaissance. Alors que les souris *Dyrk1a*^{+/-} présentent une réduction de leur viabilité, les souris homozygotes *Dyrk1a*^{-/-} décèdent au cours de l'organogénèse (Arqué et al. 2008; Vassiliki Fotaki et al. 2002). Chez l'homme, une haploinsuffisance de DYRK1A conduit au syndrome « *Mental Retardation autosomal Dominant 7* », abrégé ci-après MRD7 (Courcet et al. 2012; Møller et al. 2008; Arbones et al. 2019). Ce syndrome est caractérisé par une microcéphalie, une altération du développement du langage, de l'épilepsie, des problèmes de comportement anxieux et un trouble du spectre autistique (Bronicki et al. 2015; Earl et al. 2017; Luco et al. 2016). Ces faits mettent clairement en lumière

le rôle primordial du sous-dosage de DYRK1A dans la perturbation de mécanismes biologiques induisant le MRD7. D'autre part, un surdosage de DYRK1A peut être à l'origine des phénotypes observés chez les porteurs de T21, en particulier dans les déficits des fonctions cognitives. Pour vérifier cela, des modèles souris surexprimant uniquement le gène de la protéine DYRK1A ont été générés : le modèle Tg(MT1A-*Dyrk1a*), le modèle Tg(DYRK1A)36Wjs ainsi que le modèle Tg(*Dyrk1a*)189N3YaH.

Le modèle Tg(MT1A-*Dyrk1a*)

Les souris Tg(MT1A-*Dyrk1a*) ont été générées à partir d'un ADNc *Dyrk1a* de rat (X. Altafaj 2001). Au niveau phénotypique, ce modèle présente une altération de l'apprentissage de la marche et un manque de coordination moteur reflétant un retard du développement locomoteur (Martínez de Lagrán et al. 2004). Dans le labyrinthe de Morris, ces souris ont une altération de l'apprentissage spatial et de la flexibilité cognitive qui indique une anomalie de l'hippocampe et du cortex préfrontal. Aucune altération de leur mémoire de travail n'est observée, mais ces animaux présentent un déficit de la mémoire de reconnaissance (X. Altafaj 2001; De la Torre et al. 2014). Au niveau cellulaire, une réduction de la neurogenèse adulte et de l'arborisation dendritique du cortex ainsi que du gyrus denté est observée. De plus, un retard de croissance axonal dans des cultures de neurones corticaux de ces souris est souligné (Martinez de Lagran et al. 2012; Pons-Espinal, Martinez de Lagran, et Dierssen 2013).

Le modèle Tg(DYRK1A)36Wjs

Le modèle Tg(DYRK1A)36Wjs présente une surexpression du gène DYRK1A humain. Ces souris ont été créées par insertion d'un chromosome artificiel de bactérie (BAC) contenant le gène DYRK1A humain entier (Ahn et al. 2006). La masse du cerveau de ces animaux est 19% plus importante que celle des animaux sauvages. Hormis cette anomalie du cerveau, aucun autre organe n'est affecté, ce qui reflète un rôle considérable de DYRK1A au niveau cérébral. Des déficits d'apprentissage et de mémoire visuo-spatiale sont observés chez les souris Tg(DYRK1A)36Wjs. De plus, une perturbation dans l'activité synaptique (LTP et Dépression à Long Terme, ci-après LTD) a aussi été mise en évidence dans l'hippocampe des souris (Ahn et al. 2006). Une hyperphosphorylation des Ser202, Thr212 et Ser404 de la protéine Tau, cible de

DYRK1A associées aux microtubules, a été rapportée, reflétant une augmentation de l'activité catalytique de DYRK1A (Ryoo et al. 2007). Une augmentation de la phosphorylation de l'APP sur la Thr668 a également été observée (Ryoo et al. 2008).

Le modèle Tg(*Dyrk1a*)189N3YaH

Le modèle Tg(*Dyrk1a*)189N3YaH, ci-après Tg(*Dyrk1a*) a été construit par insertion d'un BAC contenant le gène entier *Dyrk1a* murin avec ses séquences promotrices. Un retard de croissance visible jusqu'à 60 jours postnatal est observé chez ces animaux par rapport aux contrôles. À l'âge adulte, le poids des cerveaux des souris Tg(*Dyrk1a*) augmente de 15% par rapport à celui des contrôles. De plus, une augmentation de l'axe dorso-ventral, de la taille du 3^{ème} ventricule dorsal et des ventricules latéraux ainsi que de l'hippocampe et des noyaux thalamiques est observée (Guedj et al. 2012). Les souris transgéniques pour *Dyrk1a* ont une altération de leur fonction motrice. Sur le plan cognitif, ce modèle a un déficit de la mémoire de travail et présente dans le test du labyrinthe de Morris, une altération de l'apprentissage et de la mémoire spatiale à long terme ainsi que de la flexibilité cognitive (Souchet et al. 2014). S'accompagne à cela, une augmentation de la densité en épines dendritiques du cortex, entraînant des perturbations de l'activité synaptique du cortex préfrontal des souris Tg(*Dyrk1a*) (Thomazeau et al. 2014) . Ce modèle présente aussi une altération de la fertilité chez les souris mâles transgéniques avec un dérèglement des premiers stades de la spermatogenèse similaire à celle observée chez l'homme (Dard et al. 2021).

Ces modèles de surexpression du gène *Dyrk1a* prouvent que la seule trisomie de ce gène suffit à induire certains des phénotypes présents dans le SD. Les déficits observés sont la conséquence de la perturbation des fonctions cellulaires et moléculaire de l'organisme dans lesquelles DYRK1A est impliquée. Compte tenu des nombreux mécanismes biologiques (détaillés dans la section « III. De la fonction génique de *Dyrk1a* dans le développement et la physiologie, à la correction de la dose tout au long de la vie dans le syndrome de Down ») que cette protéine contrôle à travers son activité catalytique, c'est plus l'activité excessive de la kinase que l'expression excessive qui apparaît comme capital dans les phénotypes du SD. Plusieurs preuves ont montré que la normalisation du dosage de DYRK1A permet une

amélioration des déficits cognitifs chez les modèles souris du SD. Par exemple, le croisement du modèle Ts65Dn avec des souris hétérozygotes *Dyrk1a*^{+/-} ou encore l'inhibition partielle de son expression par injection d'AAV-shRNA spécifique de *Dyrk1a* dans l'hippocampe permet la normalisation de l'activité de DYRK1A. La normalisation de l'activité de DYRK1A permet de corriger les défauts de LTP dans l'hippocampe, les capacités cognitives (l'apprentissage spatial et la mémoire associative) ainsi que les déficits visuels morphologiques et fonctionnels (García-Cerro et al. 2014; Xavier Altafaj et al. 2013; Laguna et al. 2013). L'injection dans le striatum de virus adéno-associé shRNA chez de Tg(*Dyrk1a*) conduit également à la réduction des altérations motrices (Ortiz-Abalia et al. 2008). D'autre part, des études d'inhibiteurs de DYRK1A effectuées sur les modèles souris du SD, ont permis la correction des fonctions mnésiques via la normalisation de l'activité catalytique de DYRK1A chez les modèles souris du SD. Ces travaux réalisés à partir d'inhibiteurs synthétiques ou naturels sont détaillés dans la section « III. De la fonction génique de *Dyrk1a* dans le développement et la physiologie, à la correction de la dose tout au long de la vie dans le syndrome de Down ».

Ces études montrent que le dosage de DYRK1A est donc fondamental dans les altérations caractéristiques du SD. DYRK1A et en particulier son activité catalytique, est une voie majeure pour l'établissement de traitements des déficits cognitifs associés au SD afin d'améliorer la qualité de vie ainsi que l'autonomie des porteurs de la T21.

III. De la fonction génique de *Dyrk1a* dans le développement et la physiologie, à la correction de sa dose tout au long de la vie dans le syndrome de Down


La section suivante est présentée sous forme d'une revue centrée sur DYRK1A (débutant en page 58). Cette revue, publiée en 2021, a été rédigée avec le Dr. Brault, le Dr. Duchon ainsi que le Dr. Héroult. Après une présentation de la famille des kinases DYRK, la protéine DYRK1A : son expression, sa structure ainsi que sa régulation, la revue reprend les fonctions de DYRK1A. En effet, DYRK1A est impliquée dans de nombreuses fonctions de l'organisme telles que la

prolifération cellulaire, la fonction synaptique, la régulation de l'expression des gènes ou encore les mécanismes d'apoptose. DYRK1A étant un gène impliqué dans l'apparition des troubles cognitifs dans le SD, il est donc une cible prometteuse dans le développement de traitement thérapeutique pour le SD. La revue décrit de manière détaillée les inhibiteurs de DYRK1A (naturels ou synthétiques) testés sur des modèles souris adultes du SD mais aussi les traitements ciblant DYRK1A réalisés au cours des stades anténatals et prénatals afin de normaliser le surdosage de DYRK1A au cours du développement et ainsi empêcher la perturbation des mécanismes moléculaires et cellulaires dépendants de DYRK1A.

De nouvelles études d'inhibiteurs de DYRK1A ont été réalisées entre la publication de la revue en 2021 et aujourd'hui. Notamment l'étude du PST-001, qui est un inhibiteur compétitif de DYRK1A dérivé de la Luciferin, chez le modèle souris Ts65Dn. Après trois jours d'administration de PST-001 dans la nourriture à une dose de 100 mg/kg, le test de conditionnement contextuel de la peur montre une amélioration des capacités d'apprentissage et de mémoire associative des souris Ts65Dn traitées avec le PST-001. Cependant, l'activité kinase de DYRK1A ou le niveau de phosphorylation de cibles connues de DYRK1A n'ayant pas été vérifiées, l'inhibition de l'activité catalytique de DYRK1A par le PST-001 ne peut être validée (Stensen et al. 2021). Un autre inhibiteur de DYRK1A récemment découvert est l'aristolactame BIII, un produit naturel dérivé de plantes médicinales avec une concentration inhibitrice médiane (IC50) de 9.67 nM. Ce produit a été administré oralement à des souris transgéniques pour DYRK1A, les souris Tg(DYRK1A)36Wjs, à deux doses : 10 et 30 mg/kg. Ces deux doses d'aristolactame BIII permettent de diminuer l'hyperphosphorylation de Tau provoquée par DYRK1A en plusieurs sites (Thr231, Ser202/Thr205 et Thr212) dans le cerveau des souris Tg(DYRK1A)36Wjs. De plus, l'administration de l'aristolactame BIII à une dose de 1 mg/kg rétablit l'activité locomotrice et le comportement exploratoire des souris DYRK1A transgéniques âgées de 5 mois (M. Choi et al. 2021). Cet inhibiteur de DYRK1A n'a pas encore prouvé son efficacité sur les capacités d'apprentissage et de mémoire des modèles du SD.

Review

Dyrk1a from Gene Function in Development and Physiology to Dosage Correction across Life Span in Down Syndrome

Helin Atas-Ozcan ¹, Véronique Brault ¹, Arnaud Duchon ¹ and Yann Herault ^{1,2,*} 

¹ Université de Strasbourg, CNRS, INSERM, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch Graffenstaden, France; atash@igbmc.fr (H.A.-O.); vbrault@igbmc.fr (V.B.); duchon@igbmc.fr (A.D.)

² Université de Strasbourg, CNRS, INSERM, Celphedia, Phenomin-Institut Clinique de la Souris (ICS), 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch Graffenstaden, France

* Correspondence: herault@igbmc.fr

Abstract: Down syndrome is the main cause of intellectual disabilities with a large set of comorbidities from developmental origins but also that appeared across life span. Investigation of the genetic overdosage found in Down syndrome, due to the trisomy of human chromosome 21, has pointed to one main driver gene, the *Dual-specificity tyrosine-regulated kinase 1A* (*Dyrk1a*). *Dyrk1a* is a murine homolog of the drosophila *minibrain* gene. It has been found to be involved in many biological processes during development and in adulthood. Further analysis showed its haploinsufficiency in mental retardation disease 7 and its involvement in Alzheimer's disease. *DYRK1A* plays a role in major developmental steps of brain development, controlling the proliferation of neural progenitors, the migration of neurons, their dendritogenesis and the function of the synapse. Several strategies targeting the overdosage of *DYRK1A* in DS with specific kinase inhibitors have showed promising evidence that DS cognitive conditions can be alleviated. Nevertheless, providing conditions for proper temporal treatment and to tackle the neurodevelopmental and the neurodegenerative aspects of DS across life span is still an open question.

Keywords: trisomy 21; neurodevelopmental disorder; mouse model; cognition; learning and memory; preclinical trial



Citation: Atas-Ozcan, H.; Brault, V.; Duchon, A.; Herault, Y. *Dyrk1a* from Gene Function in Development and Physiology to Dosage Correction across Life Span in Down Syndrome. *Genes* **2021**, *12*, 1833. <https://doi.org/10.3390/genes12111833>

Academic Editor: Giovanni Neri

Received: 19 October 2021
Accepted: 18 November 2021
Published: 20 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

DYRK1A encodes the dual-specificity tyrosine-regulated kinase 1A whose role in physiology and disease has been pinpointed over the years. This gene located on Human chromosome 21 (Hsa21) has benefited from the pioneering study of the *minibrain* mutant, highlighting the role of *DYRK1A* drosophila homologs in neuronal development. This major role has fostered research on the consequence of its overdosage in Down syndrome (DS), the major causes of intellectual disability. Further investigation has led to the discovery of the *DYRK1A* haploinsufficiency syndrome (also named Mental Retardation autosomal Dominant 7, MRD7). *DYRK1A* is deeply regulated both at the expression and kinase level while expressed in almost every cell. In addition, *DYRK1A* has been involved in many different cellular and molecular processes, from cell proliferation to synaptic function, from gene expression regulation to the control of pathways for apoptosis and neurodegeneration. *DYRK1A* is definitely a main gene driver of cognitive impairment in DS models, and *DYRK1A* inhibitors have emerged as a promising therapeutic path to reduce DS cognitive deficits in adults but also after in utero treatment in animal models. In addition recent advances in kinase inhibitors are ongoing with the definition of proper temporal window treatment to tackle the neurodevelopmental and the neurodegenerative aspect of DS over life span.

2. DYRK1A a Kinase with Multiple Roles at the Frontiers of Neuronal Proliferation, Differentiation, and Function

2.1. DYRK1A, a Unique Member of a Kinase Subfamily

2.1.1. The Family of DYRK Proteins

DYRK1A (dual-specificity tyrosine-regulated kinase 1A) is a member of the dual-specificity tyrosine-regulated kinases (DYRKs) family that belongs to the GMGC kinase group, including cyclin-dependent kinases (CDK), mitogen-activated protein kinases (MAPK), glycogen synthase kinase (GSK3), and the CDC-like kinase (CLK) group of protein kinases. These GMGC kinases are having pivotal roles in cell cycle regulation, intracellular signal transduction, cell growth and communication [1]. A unique feature of the DYRKs kinase domain separates them from two other close subfamilies: the homeodomain-interacting protein kinases (HIPKs) and the protein kinases 4 (PRP4) involved in regulation of pre-mRNA splicing. Since the discovery of the Yak1, the founder of the DYRK family in yeast [2], members of the DYRK subfamily have been found in all eukaryotes and are divided into two classes originating from a genetic duplication event that has occurred during metazoan evolution. DYRK1A belongs to class I DYRKs that includes also mammalian DYRK1B, *Caenorhabditis* MBK1 and drosophila minibrain (Mnb) [3], while class II includes mammalian DYRK2, DYRK3 and DYRK4, *C. elegans* MBK2 and drosophila dDyrk2 and dDyrk3. In addition to its kinase domain, DYRK1A shares with other members of the mammalian DYRKs a conserved N-terminal motif (DH-box for Dyrk Homology box) which might provide a chaperon-like function during protein maturation that stabilizes the kinase domain in an intermediate form with tyrosine autophosphorylation activity [4]. DYRK1A additionally shares with DYRK1B a nuclear localisation signal (NLS) recognized in the cytosol by the importin protein, which guides proteins towards the nuclear pores, and a PEST protein degradation signal sequence, a hallmark of short-lived proteins. Finally, a polyhistidine tract that targets the protein to splicing factor compartments within the nucleus is present in the specific C-terminal part of DYRK1A [5]. The crystal structure of the kinase domain has been obtained by co-crystallization with different inhibitors such as harmine or INDY (inhibitor of DYRK1A), showing that the N-terminal and C-terminal lobes of the catalytic domain are connected by a hinge region forming the ATP-binding pocket and containing phenylalanine 238 as a gatekeeper responsible for the selectivity of the inhibitors [6–12].

2.1.2. DYRK1A Expression and Expression Regulation

DYRK1A is encoded on the Human chromosome 21 (HSA21) in 21q22.2 and codes at least five isoforms, with two main proteins of 763 and 754 amino acids (aa), the 763 aa being ubiquitously expressed in tissues during development and in the adult, with a stronger expression in the central nervous system (CNS) [13,14], the other isoforms being rare in the brain [15–17]. During CNS development, *Dyrk1a* is first transiently detected in pre-neurogenic proliferative cells in 8 to 10.5 days postcoitum (dpc) mouse embryos. At 15.5 dpc, DYRK1A is present in cycling neuronal progenitor cells in the ventricular and subventricular zones and in differentiated neurons [18]. DYRK1A expression peaks during neuronal dendritic morphogenesis at birth [18,19] and remains expressed at lower levels during adulthood [13]. At the adult stage, DYRK1A is present throughout the brain with higher expression in the olfactory bulb, the piriform/entorhinal cortices, cerebellar cortex, periaqueductal gray and pontine nuclei, the cerebellar cortex and neurons of the oculomotor and trigeminal motor nuclei [20]. DYRK1A is not only present in neurons, but also to a lesser extent in astrocytes and microglia [20,21].

Two non-overlapping promoters that start the transcription of two splicing variants of human *DYRK1A* have been described by Maenz et al. [22], although no evidence of cell- or tissue-specific use of those promoters was found. They, however, showed a specific regulation of one of the two promoters by the E2F1 transcription factor known to regulate the expression of genes involved in cell cycle progression [22]. The REST silencing transcription factor whose expression is coordinated with that of DYRK1A during neuronal

development was shown to activate *DYRK1A* via a neuron-restrictive silencer element (NRSE) present at 833 to 815 bp of the human *DYRK1A* promoter, forming a negative feedback loop with *DYRK1A*, that can reduce its transcriptional activity [23]. Additional transcription factors can regulate *DYRK1A*. First, the transcription factor OLIG2, with a known homolog on the Hsa21, was shown by ChIP-Seq analysis to target enhancer regions of *Dyrk1a*, inhibiting its expression [24]. *Olig2* overdosage also contributes to Down syndrome developmental brain defects in mouse models [25], and its overexpression in neural progenitors causes a precocious cell cycle exit and neuronal cell death. Then, *DYRK1A* mRNA translation is MENA-dependent in developing axons. MENA is an actin regulatory protein occurring both at steady state and after BDNF stimulation and emphasizing a requirement of *DYRK1A* in axon guidance and synaptogenesis [26]. P53, the tumor suppressor protein, and P44, a shortest form, whose overexpression causes premature aging in mice [27] with cognitive decline, synaptic defects, and MAPT/TAU hyperphosphorylation [28], were found to bind to the promoter of *Dyrk1a* and activate its transcription as well as the transcription of other kinases known to be involved in MAPT/TAU phosphorylation [29]. *DYRK1A* can also phosphorylate p53, leading to the induction of p53 target genes and affecting the proliferation of rat neuronal cell lines [30].

Dyrk1a expression is also regulated by several miRNAs. The *Dyrk1a* mRNA level is reduced by miR-1246 whose expression is induced by p53 in response to DNA damage [31]. Overexpression of P53 in human lung carcinoma cells induced *miR-1246* expression which targeted *DYRK1A* mRNA 3'UTR, reducing *DYRK1A* protein levels. As the consequence of *DYRK1A* decreases, NFATC1, a target of *DYRK1A*, was no longer exported out of the nucleus leading to dramatic cell apoptosis in cancer cells [31]. miR-199b, another miR under the control of NFATC, also targets *DYRK1A* mRNA, leading to hypertrophy and fibrosis in a mouse model of heart failure [32]. Finally, a recent report identified miR-204-5p as a marker overexpressed in the serum of patients with Parkinson's disease and proposed from data analyses that overexpression of this miR positively regulates *DYRK1A* mRNA expression, leading to the death of dopaminergic cells via *DYRK1A*-mediated ER stress and apoptotic signaling cascade [33].

2.1.3. Regulation of *DYRK1A* Kinase Activity

DYRKs kinases have the particularity to be dual-specificity protein kinases, phosphorylating on tyrosine, serine, and threonine residues. In those proteins, unlike mitogen-activated protein kinases (MAPK), the kinase activity does not require an upstream activating kinase, but the kinase is constitutively activated by an autocatalytic process. *DYRK1A* autophosphorylates its second tyrosine residue (Tyr321) of its activation loop YxY motif during translation while bound to the ribosome, without the presence of chaperone proteins [34]. This tyrosine autophosphorylation produces an active *DYRK1A* with enhanced serine/threonine kinase activity [35], which cannot be inactivated by dephosphorylation of Tyr321 [36]. Based on studies of the drosophila *DYRKs* (MNB and d*DYRK2*), *DYRK1A* was first thought to lose its tyrosine phosphorylation ability after maturation [37]. However, Walte and collaborators showed that mature *DYRK1A* was still capable of tyrosine phosphorylation and that this activity is not limited to activating-autophosphorylation as they identified Tyr104 and Tyr111 in the N-terminal region as phosphorylated sites [38]. Additional autophosphorylation sites (Tyr140 and Tyr159 in the DH-box region, Tyr177 in the N-terminal lobe, and Tyr449 near the C-terminus) were found [11]. Moreover, an autophosphorylation of Ser97 was found to occur during the translation or folding process, before the occurrence of the intermediated folding form of *DYRK1A* autophosphorylating Tyr321. This phosphorylation stabilizes *DYRK1A* by blocking its degradation without affecting its catalytic activity [39]. In an in vitro analysis, autophosphorylation of Ser520 was found to be required for the interaction of *DYRK1A* with the 14-3-3 kinase-binding protein, this interaction leading to an increase of the catalytic activity of *DYRK1A* [40]. Similarly, autophosphorylation of Ser529 within the C-terminal PEST domain was shown to trigger a conformation change of *DYRK1A* that enabled it to interact with the 14-3-3 β

protein, although this interaction was not found to have any effect on intrinsic DYRK1A kinase activity [41]. Tyr 145 and 147 phosphorylated and nonphosphorylated forms of DYRK1A were described in the brains of human and mouse with DS, with phosphorylation of those two tyrosines being abundant in the neuronal cytoplasm of postnatal brains but low in nuclei of astroglial cells, adult hippocampal progenitors and some cholinergic axon terminal [42]. The nonphosphorylated Tyr-145/147 form was found to be more abundant in the trisomic brain, although the functional consequence of this phosphorylation was not elucidated [42]. Moreover, some phosphotyrosines (Tyr104, Tyr145 and Tyr147) have been described in the N-terminal domain of DYRK1A outside its activation domain by phosphoproteomics analyses (www.phosphosite.org, accessed on 1 November 2020).

SPRED1 and SPRED2, two members of the Sprouty family, that are phosphorylation substrates for tyrosine kinases in response to growth factors, were found to decrease DYRK1A phosphorylation activity on TAU and STAT3. They bind to the DYRK1A kinase domain and compete for the phosphorylation binding site for DYRK1A substrates [43]. Although DYRK1A is believed to be constitutively active after its autophosphorylation on Tyr321, phosphorylation and dephosphorylation of DYRK1A by other kinases and phosphatases have been observed. Yang et al. [44] found that bFGF was selectively activating DYRK1A by tyrosine phosphorylation, leading to gene transcription via activation of the CREB transcription factor during differentiation of hippocampal progenitor cells. DYRK1A was found to contain putative consensus phosphorylation sites for the LATS2 kinase (HxH/R/KssS/T), a component of the hippo pathway that plays a pivotal role in organ size control and tumor suppression by restricting proliferation and promoting apoptosis. Moreover, Tschop and collaborators [45] showed that LATS2 phosphorylates DYRK1A in a dose dependent manner, leading to the phosphorylation by DYRK1A of the LIN52 subunit of the DREAM complex and promoting the assembly of this repressor complex at E2F-regulated promoters. Most recently, the protein phosphatase PPM1B was found to dephosphorylate the DYRK1A Ser258 auto-phosphorylated residue, inhibiting the catalytic activity of DYRK1A and its phosphorylation of TAU, reducing toxic TAU aggregation [46]. Enhanced kinase activity can also be obtained by DYRK1A proteolysis. The calcium-activated cysteine protease calpain I has been found to proteolyze DYRK1A at its C-terminus, probably within its PEST region, resulting in a truncated form found to be increased in the brain of Alzheimer's patients and enhancing DYRK1A kinase activity toward TAU [47]. Furthermore, Souchet and collaborators [48] demonstrated that the cleaved form of DYRK1A is present in astrocytes in the hippocampus of AD patients and APP/PS1 mice, although proteolysis in their case was not associated with a modification of global DYRK1A kinase activity but was associated with a reduced kinase specificity and a stronger affinity towards STAT3a, an activator of neuroinflammation. The presence of a PEST sequence in DYRK1A also suggests a rapid turnover of the protein that can also contribute to the regulation of DYRK1A activity. In HEK293 (human embryonic kidney 293) cells, DYRK1A was observed to be degraded through the ubiquitin proteasome pathway during cell cycle progression, although this was not achieved through the PEST region but through a N-terminus unconserved binding motif (⁴⁹SDQQVSALS⁵⁷) [49].

Another key mechanism for regulation of DYRK1A activity is the control of its subcellular localization that enables to control the accessibility to its different substrates. DYRK1A was first classified as a nuclear protein [50], consistent with the two NLS signals found in the protein. However, analysis of biochemical fractions of mouse brains revealed that DYRK1A is present in both the nucleus and cytoplasm in neuronal cells, while it was only found to be mostly present in the cytoplasm of glial cells [19–21,51]. Overexpression of DYRK1A resulted in the accumulation of the protein within the splicing speckles in the nucleus, and identified a histidine stretch responsible for targeting the protein to this structure [5] in COS7 and HeLa cells. Nevertheless, Nguyen and collaborators [52] showed that overexpressed DYRK1A in the brain of Tg(*Dyrk1a*)189N3Yah (Table 1) mice accumulates in the cytoplasm and the synapse. DYRK1A was found to bind to the WD40-repeat protein WDR68, this binding leading to their nuclear translocation and not requiring any kinase

activity [53,54], whereas re-localisation of DYRK1A from the nucleus to the cytosol was found to occur when DYRK1A was bound to the brain-specific protein phytanoyl-CoA hydroxylase-associated protein 1 (PAHX-AP1) [55]. Moreover, different phosphorylated forms of DYRK1A were associated with different subcellular compartments, suggesting specific functions associated with specific phosphorylated forms and specific localisations [56].

Table 1. Transgenic line overexpressing *Dyrk1a* in the mouse.

Allele Symbol	Category—Genetic Background	Initial Reference	Repository
Tg(CEPHY152F7)12Hgc	Transgenic YAC Human- FVB or C57BL/6j including TTC3 (tetrapeptide repeat domain 3), DSCR3 (Down syndrome critical region gene 3), DYRK1A (dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A) and the potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 6 gene, (KCNJ6)	[57]	INFRAFRONTIER Stock EM:01303
Tg(MT1A- <i>Dyrk1a</i>)9Xest	Transgenic-Heterogenous promoter rat cDNA for <i>Dyrk1a</i> (2 copies)	[58]	Unknown
Tg(MT1A- <i>Dyrk1a</i>)33Xest	Transgenic-Heterogenous promoter rat cDNA for <i>Dyrk1a</i> (5 copies)	[58]	Unknown
Tg(DYRK1A)36Wjs	Transgenic BAC Human locus for DYRK1A—C57BL/6j coisogenic	[58]	JAX
Tg(<i>Dyrk1a</i>)189N3Yah	Transgenic BAC Mouse locus for <i>Dyrk1a</i> -C57BL/6j coisogenic	[59]	INFRAFRONTIER stock EM:02119

Interestingly, analysis of de novo DYRK1A mutations found in MRD7 patients pointed at mutations outside of the kinase domain with no impact on the kinase activity, suggesting kinase-activity independent functions for DYRK1A [60]. In addition to this, a synergic *Dyrk1a* and *Arip4* activating effect on androgen receptor- and glucocorticoid receptor-mediated transcriptional activation was observed independently of *Dyrk1a* kinase activity [61]. Hence, like other kinases, DYRK1A seems to have phosphorylation-independent functions such as scaffolding, allosteric regulation or protein-DNA interaction [62].

2.2. Targets and Interactors of DYRK1A

A consensus phosphorylation sequence has been determined for DYRK1A (R-P-x(1,3)-S/T-P) with DYRK1A having a preference for an arginine residue in the −2 or −3 position and for a proline at the + 1 position [63]. The specificity makes the binding different from the MAPK(PX(S/T)P). This sequence specificity has been validated in some DYRK1A target proteins such as TAU [64,65], amphiphysin [66] and caspase 9 [67]. However, phosphorylation sites that do not fit with this sequence have also been found in several DYRK1A substrates [30,68,69]. In a phosphoproteomic screen looking at differentially phosphorylated proteins in different brains structures of Tg(*Dyrk1a*)189N3Yah mice, we only found very few phosphopeptides displaying the DYRK1A consensus phosphorylation sequence, suggesting that *Dyrk1a* in Tg(*Dyrk1a*)189N3Yah differentially phosphorylates directly only very few targets, or that other DYRK1A phosphorylation sites might be overlooked [52].

Interactors and substrates of DYRK1A have helped to define the function of DYRK1A in different cellular processes and molecular cascades. To date, the BioGrid protein interaction network database listed 419 proteins presenting physical interaction with DYRK1A, most of them having been found through high-throughput affinity-capture mass spectrometry (<https://thebiogrid.org/>, accessed on 10 October 2021). In the next paragraphs, we will describe DYRK1A substrates and interactors involved in the regulation of different cellular processes throughout neurogenesis, brain function and neurodegeneration (see Figure 1 and Table 2).

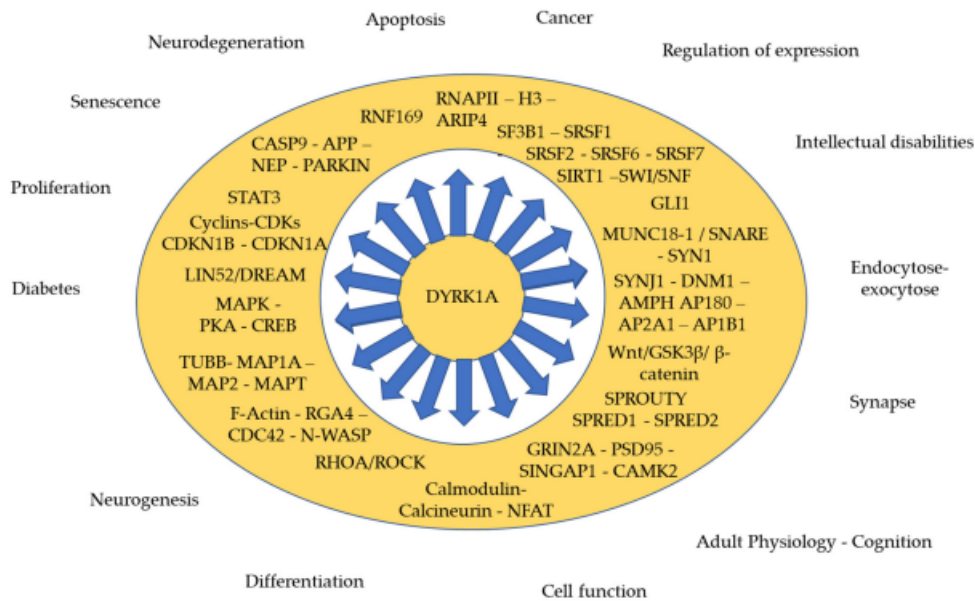


Figure 1. DYRK1A involved in various cellular processes during development and throughout the adult lifetime.

2.2.1. During Cell Proliferation and Neurogenesis

Consistent with the identification of DYRK family kinases as cell cycle regulators [70] and with the observation of microcephaly in humans, *Drosophila* and mice with *MNB/DYRK1A* haploinsufficiency [3,71–74] impaired neuronal proliferation have been reported in both loss and gain of function of DYRK1A as well as in DS individuals [75–78].

DYRK1A is a negative regulator of the G1-S phase transition. Overexpression of DYRK1A leads to an arrest of the cells in G1 phase, this lengthening of the G1 phase leading to cell cycle exit and promoting premature differentiation [76]. This cell cycle exit is triggered by upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27KIP1 (CDKN1B) [79], which was achieved by its phosphorylation by DYRK1A at Ser10 leading to its stabilization [80]. The *Drosophila* homologs Mnb regulates the expression of Decapo, the *Drosophila* homolog of p27Kip1, by upregulating the expression of the proneural transcription factors *asense* and *prospero* in *Drosophila* newborn neuronal precursors, leading to their cell cycle exit and facilitating neuronal differentiation [81]. Another cyclin-dependent kinase inhibitor, p21CIP1 (CDKN1A), is also upregulated at the transcriptional level by DYRK1A overexpression, through phosphorylation of p53, leading to impaired G1/G0-S phase transition and attenuated proliferation of immortalized rat embryonic hippocampal progenitor H19-7 cells [30]. DYRK1A additionally controls nuclear levels of Cyclin D1 by phosphorylating this protein at Thr286, promoting its nuclear export and degradation [80,82]. DYRK1A phosphorylation of LIN52 at Ser28 is required for the assembly of the DREAM complex which coordinates gene expression during the cell cycle [83]. Formation of this complex is essential for the cell to enter quiescence or to undergo Ras-induced senescence, showing the importance of DYRK1A for the suppression of cell proliferation [83]. Levy and collaborators [84] further identified growth signaling pathways that are perturbed in mouse embryonic cortices missing *Dyrk1a* expression, including *TrkB*-BDNF and mTOR signaling.

Table 2. Main DYRK1A interactors, partners and targets (* only described in yeast).

Symbol	Name	Cell Function	Ref.
Neurogenesis			
CCND1	Cyclin D1	Cell cycle and division (G1 to S phase transition)	[80,82,85]
CCNL2	Cyclin L2	transcription regulation	[86]
CDKN1A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A	Cell cycle and division (G1 to S phase transition)	[30]
CDKN1B	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B	Cell cycle and division (G1 to S phase transition)	[79,80]
LIN52	Protein lin-52 homolog	Cell cycle, transcription	[83]
SNR1	Integrase interactor	Cell cycle, transcription regulation	[87]
FGF2	Fibroblast Growth Factor 2	Mitogenic and angiogenic activity	[44]
RAS	GTPase Ras	Differentiation, transcription regulation	[88]
BRAF	B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase	Differentiation, transcription regulation	[88]
MEK1	Dual specificity mitogen-activated protein kinase 1	Differentiation, transcription regulation	[88]
GLI1	Glioma-associated oncogene 1	Differentiation, transcription regulation	[89,90]
NOTCH	Notch receptor	Differentiation, transcription regulation	[91]
GSK3b	Glycogen synthase kinase 3 β	Differentiation, neurogenesis	[92]
FKHR	Forkhead Box O1	Apoptosis, differentiation, transcription regulation	[93]
MAP1B	Microtubule Associated Protein 1B	Microtubule Dynamics, neuritogenesis, axon extension, intracellular transport	[94]
RGA4 *	Rho GTPase-activating protein 4	Actin filaments assembly	[95]
CDC42 *	Cell Division Cycle 42	Actin filaments assembly	[95]
N-WASP	Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein	Actin filaments assembly, synaptogenesis, cell cycle, cell division, mitosis, transcription	[96]
GRB2	Growth Factor Receptor Bound Protein 2	Cell differentiation	[97,98]
Adult brain function/ Synaptic activity			
YWHAZ	14-3-3 kinase-binding protein	Signal transduction, spine maturation	[40,99]
NFATC	Nuclear factor of activated T cells	Synaptic plasticity, transcription regulation	[100–102]
RCAN1	Regulator of calcineurin 1	calcineurin-NFAT signaling cascade	[103,104]
CREB	CAMP-Responsive Element-Binding Protein	Synaptic plasticity, differentiation, transcription regulation	[44]
RNAPII	RNA polymerase II	Transcription	[105]
DNM1	Dynamin 1	Clathrin-mediated vesicle endocytosis	[106–108]
AMPH	Amphiphysin 1	Clathrin-mediated vesicle endocytosis	[66,107]
SH3GL2	SHB-domain GRB2-like 2/ Endophilin 1	Clathrin-mediated vesicle endocytosis	[109]
SYNJ1	Synaptojanin 1	Clathrin-mediated vesicle endocytosis	[107,110,111]
SNAP91	Clathrin Coat Assembly Protein AP180	Clathrin-mediated vesicle endocytosis	[107]
GSK3 β	Glycogensynthasekinase3 β	Synaptic plasticity	[112]
MAP1A	Microtubule Associated Protein 1A	Clathrin-mediated vesicle endocytosis	[107]
MAP1B	Microtubule Associated Protein 1B	Axon extension, intracellular transport	[94]
MAP2	Microtubule Associated Protein 2	Clathrin-mediated vesicle endocytosis	[107]
TUBB	Tubulin β Class I/ β -tubulin	Microtubule	[113]
AP2A1	Adaptor Related Protein Complex 2 Subunit α /1 α -adaptin	Clathrin-mediated vesicle endocytosis	[107]
AP1B1	Adaptor Related Protein Complex 2 Subunit β 1/ β -adaptin	Clathrin-mediated vesicle endocytosis	[107]
STXBP1	Syntaxin Binding Protein 1	SNARE-mediated endocytosis	[114]
SYN1	Synapsin I	Neurotransmitter release	[52]
GRIN2A	Glutamate receptor, ionotropic, NMDA2A	Receptor, ion transport	[115,116]
GRIN2B	Glutamate receptor, ionotropic, NMDA2B	Receptor, ion transport	[117]
SPRY2	Sprouty 2	Receptor trafficking	[51]
SPRED1	Sprouty Related EVH1 Domain Containing 1	RTK/Ras/ERK pathway	[43]
SPRED2	Sprouty Related EVH1 Domain Containing 2	RTK/Ras/ERK pathway	[43]
CAMK2	Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase II	Synaptic plasticity	[118]
DLG4	discs large MAGUK scaffold protein 4 /Post-Synaptic Density Protein 95	Synaptic plasticity	[117]

Table 2. Cont.

Symbol	Name	Cell Function	Ref.
		Adult brain function/ Synaptic activity	
SYNGAP1	Synaptic Ras GTPase Activating Protein 1	Synaptic plasticity	[117]
	SWI/SNF-Related Matrix-Associated		
SWI/SNF	Actin-Dependent Regulator Of Chromatin Subfamily	Chromatin remodeling	[119]
ARIP4	Androgen Receptor-Interacting Protein 4	Chromatin remodeling, ATP, DNA and Nucleotide-binding	[61]
H3	Clustered Histone 14	Chromatin, chromosomal stability	[120]
SF3B1	Splicing factor 3b, subunit 1	mRNA processing, mRNA splicing	[68]
SRSF1	Serine/Arginine Rich Splicing Factor 1	mRNA processing, splicing and transport	[121–124]
SRSF2	Serine/arginine-rich splicing factor 2	mRNA processing, splicing and transport	[121–124]
SRSF6	Serine/arginine-rich splicing factor 6	mRNA processing, splicing and transport	[121–124]
SRSF7	Serine/arginine-rich splicing factor 6	mRNA processing, splicing and transport	[121–124]
RNF169	Ring Finger Protein 169	Repair following DNA damage	[125–127]
		Neurodegeneration/Cell death	
MAPT	Microtubule-associated protein	Microtubule dynamics	[64,128,129]
APP	Amyloid precursor protein	Apoptosis, cell adhesion, endocytosis	[130,131]
CASP9	Caspase 9	Apoptosis	[132,133]
SNCA	α -synuclein	SNARE-mediated endocytosis	[134]
LATS2	Large Tumor Suppressor Kinase 2	Cell proliferation, apoptosis	[45]
SIRT1	Sirtuin 1	Histone deacetylation/ cell survival	[135]
SEPT4	Septin 4	Nucleotide-binding,	[136]
PSEN1	Presenilin 1	Neuronal degeneration, apoptosis, cell adhesion, Notch signaling	[137]
NEP1	Nephrilysin	A β -degrading enzyme	[138–140]
IDE	Insulin Degrading Enzyme	Intercellular peptide signaling	[138–140]
PARK2	Parkin	Autophagy, transcription regulation	[141]
HIP1	Huntingtin interacting protein 1	Apoptosis, differentiation, endocytosis, transcription regulation	[142]
HAP1	Huntingtin Associated Protein 1	Vesicular trafficking	[143]
DCAF7	DDB1 and CUL4 associated factor 7	Ubl conjugation pathway	[53,54,143]
CAPN1	Calpain 1	Protease activity	[47]
STAT3A	Signal Transducer And Activator Of Transcription	Activator neuroinflammation	[48]
PHYHIP	Phytanoyl-CoA α -hydroxylase associated protein 1	DYRK1A interacting protein	[55]

DYRK1A can disrupt cell cycle progression by acting on microtubule dynamics in mitotic spindles of *Xenopus tropicalis* embryonic forebrain cells [144]. Furthermore, localization of Dyrk1a to ciliary axonemes in ciliated tissues suggests a role of DYRK1A in ciliogenesis [144]. DYRK1A might directly target β -tubulin phosphorylation in microtubule formation as regulation of microtubule dynamics occurs via the phosphorylation of this protein by MNB in *Drosophila* dendritic arborization neurons [113]. DYRK1A regulation of microtubule dynamics but also of other cytoskeletal proteins, such as actin, additionally plays a role in neuritogenesis and synaptogenesis. DYRK1A overexpression leads to reduction of dendritic branching and spines in the brain of DS mouse models and human patients [145–148], while underexpression of DYRK1A in leads to reduced neurite length and increased neurite branching [74,94,149,150]. DYRK1A overexpression promotes neurite outgrowth by forming a complex with RAS, B-RAF and MEK1, enhancing the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells [88], while knockdown of DYRK1A compromises neuritogenesis by decreased phosphorylation of the microtubule-associated protein 1B (MAP1B) at Ser1392 [94]. Contribution of DYRK1A to the regulation of actin dynamics has been observed in Yeast, with its *Schizosaccharomyces pombe* homolog interacting with the GTPase-activating protein RGA4 and contributing to the proper localization of RGA4 and the F-actin regulator CDC42 GTPase to cortical sites of the cell where F-actin structures are localized to generate cell polarity [95] and with its Mnb homolog identified

in a kinome RNAi screen based on cell morphology as a modulator of actin-based protrusion [151]. Control of actin filament assembly by DYRK1A during neuronal dendrite and dendritic spines development occurs through multiple threonine phosphorylation of the N-WASP protein within its GTPase-binding domain, leading to the reduction of Arp2/3-mediated actin filament assembly [96].

2.2.2. Synaptic Function

Many hints suggest that DYRK1A is not only implicated in neurogenesis but also plays a role in adult brain function. DYRK1A is expressed in mature brain neurons [20,21]. Deficits in learning and memory observed in DS mouse models as well as transgenic mice overexpressing *Dyrk1a* have been associated with increased long-term depression (LTD) at the expense of long-term potentiation (LTP) [152–157]. Moreover, decreased basal synaptic activity was measured in cortical primary cultures from Tg(*Dyrk1a*)189N3Yah mice [148] and increased in the amplitude of miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) was observed in pyramidal neurons of the prefrontal cortex of the same model [158]. Interestingly, we and our collaborators have observed, in the hippocampus of trisomic mouse models, a downregulation of some immediate-early genes (*Npas4*, *Arc*, *c-Fos* and *FosB*) encoding proteins involved in transduction signals that are induced in response to a wide variety of cellular stimuli and that are implicated in neuronal plasticity [159,160]. We also found a decrease in RHOA/ROCK signaling in the DS hippocampi that controls the building and maintenance of dendrites [160,161]. Maintenance of adult brain neural activity might occur via regulation by DYRK1A of the transcription factors NFAT [101] and CREB [44] that are both involved in synaptic function [162–164]. Moreover, DYRK1A phosphorylates the GRIN2A (NR2A) subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) at the post-synaptic membrane, modifying its activity and decreasing its internalization [115,116] and hence increasing its concentration at the post-synapse. Interestingly, DYRK1A have found to be associated with other post-synaptic proteins such as NR2B, PSD95, SYNGAP1 and CAMK2 [117]. DYRK1A might also regulate intracellular receptor trafficking via its interaction with SPROUTY, a protein involved in the control of receptor trafficking [51]. DYRK1A also phosphorylates or interacts with proteins known to play a crucial role in synaptic plasticity such as GSK3 β [112], CAMKII [118] and RAS, RAF and MEK1 proteins from the MAPK/ERK signaling pathway [88]. DYRK1A was found to phosphorylate many proteins involved with membrane trafficking and vesicle endocytosis, a mechanism that is crucial for membrane recycling after neurotransmission release and hence for proper synaptic activity. DYRK1A regulates clathrin-mediated vesicle endocytosis via phosphorylation of the phosphatase synaptojanin I, the GTPase dynamin I, the scaffold protein amphiphysin I (AMPH) and the clathrin assembly proteins AP180, MAP1A, MAP2 and α - and β -adaptins [66,107–111,165]. Overexpression of DYRK1A in fibroblasts and neurons results in the inhibition of endocytosis due to defects in clathrin-mediated endocytosis [166]. Evidence for a role of DYRK1A at the pre-synapse comes from its localization and its tight coupling to the endocytic machinery [111,167]. DYRK1A was found to interact with and/or phosphorylate the presynaptic proteins MUNC18-1, a central regulator of SNARE-mediated exocytosis [114], the α -synuclein which chaperones the SNARE-complex assembly [134] and SYNAPSIN I involved in the maintenance of the reserve of the synaptic vesicle pool at the pre-synapse [52]. Interestingly, in an in-depth transcriptomic analysis of the hippocampus of six DS mouse models, Duchon and collaborators highlighted DYRK1A and SNARE as part of six central hubs connecting six major biological subnetworks deregulated in those models [160].

2.2.3. Regulation of Expression (Methylation, Transcription, Translation)

Consistent with its presence in the nucleus, DYRK1A has a substantial number of target proteins that are transcription factors or proteins involved in gene expression. One mechanism of action of DYRK1A on those proteins is by altering their subcellular localization. DYRK1A negatively regulates NFAT by exporting it from the nucleus via its

phosphorylation [100–102]. DYRK1A was shown to phosphorylate the GLI1 transcription factor involved in the Hedgehog signaling pathway at Ser408 in its NLS, promoting its nuclear import and its activation [89,90]. DYRK1A moves to the nucleus to interact with the intracellular domain of the Notch transmembrane receptor, promoting its phosphorylation in the Ankyrin domain and reducing its capacity to sustain transcription [91]. DYRK1A phosphorylates the FKHR transcription factor at Ser329, leading to a nuclear exit and a decreased gene transactivation [93]. DYRK1A also regulates gene transcription more directly by phosphorylating the C-terminal domain of RNA polymerase II (RNAPII) at Ser2 and Ser5 [105].

DYRK1A does not only mediate gene transcription via its action on transcription factors but also via the regulation of proteins involved in chromatin modification. DYRK1A phosphorylates the sirtuin SIRT1 at Thr522, promoting histone deacetylation [135]. DYRK1A was found to bind to the SWI/SNF chromatin remodeling complex known to interact with the neuron-restrictive silencer factor (REST/NRSF) and its overexpression led to perturbation of the expression of a cluster of gene located near the REST/NRSF binding sites and essential for neuronal differentiation [119]. DYRK1A interacts with the SNF2-like chromatin remodeling ATPase ARIP4 and synergistically activates androgen receptor-mediated and glucocorticoid receptor-mediated transcription [61]. DYRK1A also phosphorylates histone H3, antagonizing chromatin binding of the heterochromatin protein HP1 and leading to the transcriptional activation of genes involved in stress response including cytokines [120].

The presence of DYRK1A in the splicing factor compartment in nuclear speckles [5] has indicated a role of DYRK1A in RNA processing. DYRK1A was found to phosphorylate the splicing factor SF3b1/SAP155 at Thr434 both in vitro and in vivo [68]. DYRK1A also phosphorylates the alternative splicing factors ASF, SC35, SRp55 and 9G8, preventing inclusion of the alternatively spliced exon 10 of *Mapt/Tau* mRNA [121–124].

Recently, several studies have revealed an additional role of DYRK1A in DNA damage repair via its interaction with the ring finger protein RNF169, a negative regulator of double-strand breaks (DSB) repair, that leads to the recruitment of the 53BP1 scaffolding protein associated with non-homologous end joining (NHEJ)-promoting factor, at the DSB sites [125–127].

2.2.4. Apoptosis, Neurodegeneration

In addition to being a neurodevelopmental disorder, DS is also characterized by accelerated aging. Signs of early aging are particularly prominent in the neurological system, with an extremely high prevalence of dementia and early onset of Alzheimer's disease (AD) in DS [168]. Mouse models of DS recapitulate neurodegenerative DS phenotypes including the degeneration of basal forebrain cholinergic neurons and locus coeruleus noradrenergic neurons, neuro-inflammation and enhanced oxidative stress [169–177], but they do not present any A β deposits in their brain although studies reported increased of soluble and/or insoluble A β [175,178–180]. Although DYRK1A has been shown to have a protective effect against neuronal death, it also appears to be involved in neurodegenerative diseases including AD, Parkinson's disease (PD) and Huntington's disease (HD), and a link was found between DYRK1A and pro-inflammatory pathways that are activated in the brain of DS individuals and participate in the pathological mechanisms of neurodegenerative disorders. We will review here the interactions of DYRK1A with the different actors of those processes.

In 2008, Seifert and collaborators identified the cysteine aspartyl protease caspase 9 as a novel substrate of DYRK1A [132]. Caspase 9 is a critical component of the intrinsic or mitochondrial apoptotic pathway. The procaspase 9 is recruited to the apoptosome complex, where its dimerization by APAF-1 leads to its autocatalytic processing and activation [181]. Caspase 9 is activated by protein kinases of different transduction pathways initiated by extracellular signals or cellular stresses [182–184]. Active caspase 9 activates downstream effector caspases such as caspase 3 and caspase 7, leading to disassembly of the cell [185]. Seifert and collaborators showed that DYRK1A phosphorylates caspase 9 at its Thr125 in the

cell nucleus and inhibits its auto-processing, setting a threshold for its activation through a basal inhibitory phosphorylation [132]. Moreover, they demonstrated that Caspase 9 inhibition by DYRK1A occurs in response to cell hyperosmotic stress [132]. Regulation of apoptotic cell death via this process was demonstrated in retinal progenitor cells [133]. A protective role of DYRK1A against apoptosis was also found in neuroprogenitor cells via phosphorylation of the huntingtin interacting protein 1 (HIP1), blocking HIP1-mediated cell death [142] and of the sirtuin SIRT1 on Thr522, triggering deacetylation of p53 and promoting cell survival [135].

Although neurodegeneration in AD was initially explained by the presence of the β -amyloid precursor protein (APP) gene on the Hsa21, increasing evidence points at a role of DYRK1A in neurodegenerative processes [99,186,187]. DYRK1A overexpression could be a primary risk factor contributing to the enhancement of β -amyloidosis as it was found to hyper-phosphorylate APP at Thr668 in vitro and in Tg(*Dyrk1a*)189N3Yah mice, increasing its cleavage by β - and γ -secretases and resulting in the formation of A β 40 and A β 42 peptides [130,131,188,189]. Moreover, DYRK1A was found to phosphorylate presenilin 1 (PS1), a key component of the γ -secretase complex, increasing γ -secretase activity and the generation of β -amyloid [137]. Finally, DYRK1A also phosphorylates the A β degradation enzymes neprilysin (NEP) and the insulin degrading enzyme IDE, decreasing their activity [138,140]. DYRK1A additionally contributes to neurodegeneration and AD pathology by a hyperphosphorylation of the microtubule-associated protein TAU, priming it to phosphorylation by GSK3 and leading to MAPT/TAU self-aggregation and the appearance of neurotoxic fibrillary tangles [64,128,129,190]. DYRK1A also contributes to tauopathies by the regulation of *Mapt/Tau* mRNA splicing through the phosphorylation of different splicing factors. Phosphorylation of the splicing factors ASF, SC35 and SRp55 by DYRK1A prevents the promotion of *Mapt/Tau* exon 10 inclusion by those factors leading to an overproduction of the 3R-TAU form at the expense of the 4R-TAU, leading to of 3R/ 4R TAU ratio imbalance, exacerbating AD disease [121,123,124]. DYRK1A phosphorylates α -synuclein, a major component of the Lewi bodies (LB) that are found in several neurodegenerative disorders including Parkinson's disease (PD), dementia with LB and AD, enhancing its aggregation within the cytoplasm of neurons and glial cells [69]. DYRK1A was also found to phosphorylate the PD-associated protein parkin at Ser131, inhibiting its ubiquitin E3 ligase activity and impairing the degradation of its substrates and leading to the induction of dopaminergic cell death [141]. Septin 4 (SEPT4), a GTPase previously found in neurofibrillary tangles of AD and in LB was also found to be a substrate of DYRK1A in neocortical neurons, expanding the mechanisms by which DYRK1A is implicated in neurodegenerative diseases [136]. DYRK1A is also associated with neuroinflammation which is implicated in neuronal damage and the onset of neurodegenerative diseases. Chronic glial cell activation results in the continuous release of proinflammatory cytokines, increasing neuronal death. DYRK1A was found to contribute to the development of the inflammatory microenvironment by removing the transcriptional repression on inflammatory cytokines by phosphorylating H3 and hence preventing the recruitment of the heterochromatin protein HP1 that normally inhibits the transcription of inflammatory interleukins [120]. Recently, Latour and collaborators [191] also found a link between DYRK1A and the proinflammatory NF κ B signaling pathway, DYRK1A overexpression leading to the stabilization of I κ B α protein levels by inhibition of calpain activity.

3. DYRK1A as a Target for Improving DS Cognition in Young Adults

DYRK1A has been the focus of many investigations where some groups demonstrated its involvement in cognitive dysfunction in DS models [160,192–195]. Several pieces of evidence showed that the decrease of DYRK1A activity to a normal level leads to the rescue of cognitive phenotypes in adult mice. Different strategies were used such as the expression of a short hairpin RNA against *Dyrk1a* transcripts introduced in the brain by adeno-associated viruses [196] or the treatment with drugs to reduce the kinase activity [197,198] or combining a full knock-out mouse with a DS model to go back to

a normal gene dosage [195]. This rescue strategy emphasizes the major role of *Dyrk1a* overexpression in the appearance of the cognitive phenotypes observed in the partial DS mouse models. In this chapter, we decided to focus on drugs that target the protein DYRK1A. We selected those that have been tested in DS adult mouse models (Table 3) and for which relevant rescue results have been reported on cognition. Moreover, we will introduce some new DYRK1A inhibitors never tested on in vivo DS mouse models.

Table 3. Targeting DYRK1A activity using specific inhibitors in vivo with DS models.

DYRK1A Inhibitors	Animal Models Tested	Effects on Animal Models	Clinical Trial	Ref.
Harmine	Tg(<i>Dyrk1a</i>)189N3Yah 2 months age, 10 mg/kg, intra-peritoneal (i. p.) daily injection	Decrease in homocysteine and ERK $\frac{1}{2}$ liver	No information	[199]
EGCG	YAC;tg152F7 From gestation to adulthood, orally administration at 0.6–1 mg/day or 1.2 mg/day Tg(<i>Dyrk1a</i>)189N3Yah 3–4 months age, oral administration at 200 mg/kg/day during 4–6 weeks. Tg(<i>Dyrk1a</i>)189N3Yah 3 months age, administration in drinking water during 1 month Ts(17 ¹⁶)65Dn 3 months age, administration in drinking water during 1 month	Restoration of brain weight and morphology and object recognition memory Normalization of the long term potentiation and spine density in the prefrontal cortex. Improvement of novel object recognition memory and spatial learning and memory. Spatial learning and memory recovery.		[198] [158] [197]
Leucettine 41	Tg(<i>Dyrk1a</i>)189N3Yah 20 mg/kg Ts(17 ¹⁶)65Dn 20 mg/kg Dp(16)1Yey 20 mg/kg Tg(<i>DYRK1A</i>)36Wjs 20 mg/kg 8 to 10 weeks old, Acute oral administration of 75 mg/kg Administration of 100 nM from embryo stage until adulthood stage	Improvement of novel object recognition memory Improvement of novel object recognition memory Improvement of novel object recognition memory Change in functional connectivity in brain area Normalization of TAU-pThr212 Rescue eyes and wings deformities	2016, Barcelona, Spain, Phase 2 trial. Realize on 76 children (6 and 12 years old) which received a daily dose of 10 mg/kg/day of EGCG Not done	[200] [52]
CX-4945	Drosophila larvae Administration of 100 nM from embryo stage until adulthood stage	Rescue eyes and wings deformities	Not tested	[201]
F-DANDY	Ts(17 ¹⁶)65Dn Administration by i. p., at 20 mg/kg/day	Rescue of spatial learning deficit	Not tested	[202]
INDY	<i>Xenopus laevis</i> Embryos treated with 2.5 μ M	Eyes deformities correction	Not tested	[9]
FINDY	<i>Xenopus</i> Embryos treated with 2.5 μ M	Restoration of neural tissue malformation	Not tested	[39]

3.1. Natural Product Derived DYRK1A Inhibitors and Their Derivatives

3.1.1. Harmine, a Structural Analogue of β -Carboline and an Indole Derivate

Harmine is an alkaloid β -carbolinic with a pyrido[3,4-b] indole ring structure isolated from *Banisteriopsis caapi*. It is a natural inhibitor of DYRK1A kinase activity [34]. Harmine is an ATP-competitive inhibitor of DYRK1A with a half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of 0.08 μ M [203]. Harmine was tested on two DS mouse models: (i) the Tg(*Dyrk1a*)189N3Yah model overexpressing *Dyrk1a* [204]; and (ii) the Ts(17¹⁶)65Dn model called Ts65Dn [205]. This model results from a reciprocal chromosomal translocation and is trisomic for 132 genes from the distal part of mouse chromosome (MMU)16 and for 60 genes from the centromeric part of MMU17 which are not orthologous to those of human chromosome 21 [206]. Harmine induced a decrease in homocysteine and in the Extracellular signal-Regulated Kinases (ERK) $\frac{1}{2}$ level, due to a targeted effect on DYRK1A kinase activity [199] in the liver of Tg(*Dyrk1a*)189N3Yah mouse. Moreover, harmine prevents the maturation of neuronal progenitors in the Ts65Dn model [207]. At the molecular level, harmine produced a decrease of TAU phosphorylation in H4 neuroglia cells overexpressing TAU [208]. TAU being a substrate of DYRK1A, this phosphorylation decrease reflects reduced DYRK1A kinase activity [128]. However, harmine is also known to target the monoamine oxidase-A (MAO-A), inhibiting the neuro-system circuit involved in behavior and mood control (serotonin, noradrenaline and dopamine axes) [209–211]. As such, harmine has neurotoxic side effects with the appearance of convulsions, involuntary movements and stiffness of the limbs. Accordingly, the use of harmine is not recommended on animal models or on human beings [212,213]. Consequently, derivatives of harmine have been synthesized to selectively inhibit DYRK1A without acting on MAO-A [211]. One of the optimized analogs, AnnH75, does not have effects on MAO-A activity, and still has the ability to decrease the phosphorylation of three known substrates of DYRK1A in HeLa cells: the splicing factor 3b1 (SF3B1) on Thr434, septin 4 (SEPT4) and TAU on Thr212. In addition, this inhibitor has been shown to be effective on the autophosphorylation of DYRK1A. The harmine derivative, AnnH75, did not show cytotoxicity in in vitro studies, but its efficiency and lack of neurotoxicity still need to be proven in in vivo studies.

3.1.2. Epigallocatechin Gallate Is the Most Broadly Used DYRK1A Inhibitor

Epigallocatechin gallate (EGCG), the most abundant catechine of the green tea, is a DYRK1A non-competitive inhibitor with an IC₅₀ of 0.33 μ M [214] used in preclinical and in human clinical studies [197,198,200,215,216]. The supplementation of pure EGCG, or EGCG together with other catechines to mouse models overexpressing DYRK1A, such as Tg(*Dyrk1a*)189N3Yah, YActg152F7 and Ts65Dn mice, and to human, improves cognition and functional connectivity [158,197,198,200]. However, the administration of EGCG (50 mg/day during seven weeks) to the Ts65Dn model did not correct the deficit observed in the Morris water maze test [215,217]. Moreover, the deficit observed in Ts65Dn mice in the Novel Object Recognition test (NOR) was not found in the study of Stringer et al. [215] so they could not conclude about the effect of EGCG on the recognition memory. These results suggest that some behavioral deficits observed in the Ts65Dn line are not strictly due to *Dyrk1a* overexpression by itself, showing that overexpression of *Dyrk1a* is not sufficient to induce cognitive deficits in mouse models of DS. In addition, EGCG can act on many other targets, such as vimentin (intermediate filament) receptors of laminin, or the receptor of endocannabinoids and can have many secondary effects in cell division, migration or in the regulation of the neurotransmission. Nonetheless, EGCG was used in a clinical study which lasted 12 months (realized from 2014 to 2015 in Barcelona, Spain). In this study, 84 people with DS, aged between 16 and 34 years old, received a dose of 9 mg/kg/day of EGCG, and showed significant improvement of their visual recognition memory, their ability to control inhibition and their adaptive behavior [200].

3.1.3. Imidazolone DYRK1A Inhibitor

Another DYRK1A inhibitor is the Leucettine 41 (L41), a synthetic analogue of imidazolones derived from the alkaloids of the marine sponge *Leucettamine B*. Compared to Harmine and EGCG, L41 has a higher specificity for DYRK1A with an IC₅₀ of 0.04 μ M [218]. It acts as a competitive inhibitor for the fixation site of ATP. Administration of L41 during 19 days at a concentration of 20 mg/kg in adult mice overexpressing DYRK1A in various DS models (Tg(*Dyrk1a*)189N3Yah, Ts65Dn and Dp(16)1Yey [219]) leads to a correction of memory deficits evaluated by the NOR task and a normalization of DYRK1A kinase activity in the brain of those mice [52]. However, the L41 was not able to rescue the object location memory in the Tg(*Dyrk1a*)189N3Yah model, emphasizing that memories tested in location and object recognition tasks are not under the control of the same molecular mechanisms. Using the functional magnetic resonance imaging (MRI), a change in the functional connectivity of specific brain areas involved in cognitive processes such as the hippocampal formation, the thalamus, the pallidum and the cingulate cortex, was observed after 19 days of L41 treatment of Dp(16)1Yey mice. Moreover, a quantitative phosphoproteomic study, comparing Tg(*Dyrk1a*)189N3Yah and Ts65Dn mice treated with L41 and control mice, revealed new protein interactors of DYRK1A: the SYNAPSIN protein involved in the synaptic response, and other cytoskeletal components involved in axonal organization. Further co-immunoprecipitation and kinase activity assays show that DYRK1A phosphorylates directly SYNAPSIN1 on Ser551 [52]. In addition, L41 has shown a neuroprotective role against the cytotoxicity induced by over dosage of glutamate in extracts of mice hippocampal HT22 immortalized cells and against the neurodegeneration induced by the amyloid precursor protein (APP) in cultures of rat cortical cells [10]. A protective effect was again reported in a mouse model of Alzheimer's disease after receiving an intra-cerebroventricular injection of amyloid- β_{25-35} peptides. L41 administration provides a protection mechanism to these mice against cognitive decline induced by the presence of the amyloid- β_{25-35} peptide in working memory and spatial memory [220].

3.2. Synthetic DYRK1A Inhibitors

The CX-4945, a benzo[c][2,6]naphthyridine-8-carboxylic acid derivative, is a synthetic ATP-competitive inhibitor of DYRK1A with an IC₅₀ of 6.8 nM [201]. CX-4945 was tested on a mouse model overexpressing the human DYRK1A gene (Tg(*DYRK1A*)36Wjs). The inhibition of DYRK1A activity by CX-4945 in this model was validated by the normalization of Tau-pThr212, a phosphorylation known to be mediated by DYRK1A. No cognitive assays were performed in this study [128,201]. In addition, applying this inhibitor on HEK293 cultured cells revealed a decreased phosphorylation of some DYRK1A targets such as Tau-pThr212, Presenilin-1 (PS1) and APP-pThr668 [201]. Moreover, CX-4945 allows for rescuing the eye and wing defects observed in a *Drosophila larvae* model overexpressing DYRK1A [201]. However, because of the structural similarity of the CX-4945 with harmine, the use of this inhibitor on animal models or human should be monitored for any neurotoxicity.

A new family of azaindole derivate inhibitors, to which harmine belongs, was developed: F-DANDYs, with a 3,5-diaryl-7-azaindole structure [221]. Effectiveness of one of this fluorinated derivatives (the 3-(4-fluorophenyl)-5-(3,4-dihydroxyphenyl)-1H-pyrrolo[2,3-*b*]pyridine) was reported in Ts65Dn mice after two weeks of intraperitoneal administration at a dose of 20 mg/kg. Indeed, a rescue of the spatial learning deficit observed in the Morris water maze task [202] was shown, revealing the therapeutic potential of this fluorinated member of the F-DANDY family. Moreover, DANDY's ability to decrease DYRK1A kinase activity on Tau was proved in HEK293 cells [202].

3.3. Promising DYRK1A Inhibitors as Therapy for DS

3.3.1. Benzothiazole Derivates DYRK1A Inhibitors

Over these last 15 years, several DYRK1A synthetic inhibitors were discovered. For most of these molecules, the in vivo effect on the cognition of DS mouse models has not

been studied yet. For example, INDY is a synthetic inhibitor derivate from a dual specificity protein kinase (CLK) inhibitor called TG003. This derivate is three times more specific for DYRKs with an IC₅₀ of 0.24 μ M [9]. It was shown by Woods et al. (2016) that INDY can inhibit DYRK1A activity through the decrease of TAU-phosphorylation on Thr212 in COS7 cells [130]. Moreover, in another study by Arron et al. [101], INDY was shown to be able to restore the calcineurin-NFAT pathway initially inhibited by DYRK1A overexpression in HEK293 cells. The proINDY, a prodrug of INDY that is more lipophilic and has a better membrane absorption, showed the same results on TAU-pThr212 phosphorylation and on the calcineurin-NFAT pathway as INDY. Moreover, administration of proINDY to *Xenopus laevis* embryos allows for correcting the deformities in the eyes and head due to over activity of DYRK1A. Another derivative of INDY, called BINDY (benzofuro-fused INDY), was developed from the basic skeleton of the interacting area discovered from the crystal structure of the DYRK1A/INDY complex. With a change in the phenol group of INDY by a dibenzofuran, they produced the BINDY derivative which presents a higher specificity to DYRK1A with an IC₅₀ of 25.1 nM [222].

3.3.2. Compounds Acting on DYRK1A Kinase Activity Stability

FINDY (Floding Intermediate-selective inhibitor of DYRK1A) and CaNDY (CDC37 association inhibitor for DYRK1A) are two new synthetic inhibitors of DYRK1A acting on the stability and/or the maturation of DYRK1A. These inhibitors delete the auto-phosphorylation of DYRK1A by antagonizing the interaction between DYRK1A and the kinase specific co-chaperone CDC37. The consequence is a structural destabilization and the degradation of DYRK1A during the maturation process in living cells [39,223]. FINDY was also tested in vivo in a *Xenopus* embryo model that overexpresses DYRK1A leading to malformations of neural tissues [39]. These phenotypes were corrected after FINDY administration. CaNDY is another competitive inhibitor of DYRK1A activity with an IC₅₀ of 7.9 nM [223]. This inhibitor has been discovered by screening kinase inhibitors in 293T cells using a fusion protein: CDC37 linked to a component of *Oplophorus* luciferase, the CDC37-nanoKAZ.

3.3.3. Compounds Discovered from Functional Cellular Analysis

GNF7156 and GNF4877, which are aminopyrazine compounds, were identified by screening mice cells in order to identify molecules which induce the pancreatic β -cell proliferation [224]. This study shows that GNF7156 and GNF4877 inhibit DYRK1A with an IC₅₀ of 100 and 6 nM, respectively [225].

Moreover, ALGERNON (Altered GEneration of NeurONs) has been discovered in a screening of proliferation-enhancer activity compounds in neural stem cells (NSC). This drug aims to correct the alteration in neurogenesis found in DS models. This new inhibitor of DYRK1A has good pharmacokinetics with an IC₅₀ of 77 nM [226].

4. Antenatal and Prenatal Treatment

DS is a neurodevelopmental disorder, characterized by brain malformations originating during development of the embryos. Thus, the possibility to reduce DYRK1A activity during early prenatal stages, to compensate the aversive effects of its overdosage (due to the presence of an additional copy), was tested by [195] using a genetic approach. The results obtained pave the way to carry early prenatal treatment with DYRK1A inhibitors. The goal is to obtain a stable compensation of the adverse effects due to DYRK1A overdosage for the rest of the life while treating very early during in utero development.

The first attempt to demonstrate the effect of prenatal intervention with a DYRK1A inhibitor was done using a DS mouse model which carries a YAC construct overexpressing *Dyrk1a*, and a small number of genes (*Pipg*, *Ttc3*, *Dscr9*, *Dscr3*). An EGCG diet (0.6 to 1.2 mg/day) was initiated at the beginning of pregnancy until adulthood [198]. The treatment induced a significant reduction of brain weight and thalamus-hypothalamus volume in transgenic treated animals compare to the non-treated Tg. Using a novel object

paradigm, they showed that the EGCG treatment also rescues cognitive impairment. They also scored the working memory using a Y-maze paradigm, but the DS mice did not show any defect. At the molecular level, the mRNA of brain derived neurotrophic factor, a member of the nerve growth factor family, and its plasma membrane receptor TRKB, were corrected to normal levels in the hippocampus of Tg mice. This protocol was the first proof of concept that modulation of DYRK1A, starting at early stages of development potentially, could correct phenotypes induced by DYRK1A overdosage. Nevertheless, certain questions remained and need to be addressed. Firstly, it was not possible to know if this correction occurred during embryogenesis or adulthood because the treatment was not continuous. Secondly, there was no analysis of the cellular, physiological or signaling pathways that were implicated, and, thirdly, they did not test if the treatment could have a similar effect on a more complex DS mouse model.

In order to go further, a new study was done with three different treatments and a dose of 50 mg EGCG/kg (estimate for a 25 g mouse eating 5 g per day). The first treatment consisted of administering the compound only during the gestation period until weaning. The second treatment was pursued until adulthood, and the third one was given only at adulthood stage [227]. EGCG was administered to Tg(*Dyrk1a*)189N3Yah mice and to the more complex Dp(16)1Yey DS mouse model. The authors analyzed the excitatory/inhibitory balance which has been found to be disrupted in the brain of individuals with DS and in DS mouse models. This disruption probably results in too much GABA-related inhibition. However, deficits in excitatory inputs and glutamatergic transmission could also contribute to this imbalance (for review, see [228,229]). Tg(*Dyrk1a*)189N3Yah and Dp(16)1Yey mice present several common phenotypes in excitatory/inhibitory balance, in particular an increased density of GAD67 neurons and an overexpression of hippocampal GAD67, an enzyme that synthesizes GABA for neuron activity. The hippocampal stratum radiatum of untreated Tg(*Dyrk1a*)189N3Yah mice showed an increased density of GAD67 neurons and an overexpression of hippocampal GAD67. Similar results were obtained with other GABAergic markers (GAD65, GABA transporter). The two prenatal treatments corrected both phenotypes. In addition, when the treatment was stopped at weaning, the correction was maintained in the animal up to the age of 69 days, whereas treating adult mice did not modulate those phenotypes. Conversely, the correction of excitatory markers was more pronounced than that of inhibitory markers when treatment was only done in adult. In Dp(16)1Yey mice, significant effects of prenatal treatments were observed on the ratio of GAD67/NEUN in the stratum radiatum or on GAD67/GAD65 expression in the hippocampus. Moreover, the prenatal correction of GABAergic pathways which is maintained from weaning to adulthood correlates with the rescue of novel object recognition. This suggests that DYRK1A hyperactivity at the early prenatal stage is the source of the perturbation of the excitatory/inhibitory balance found in adults as the inhibition of DYRK1A kinase activity during in utero development was able to restore an almost normal excitatory/inhibitory balance in trisomic mice. This restoration has a long-term beneficial effect until adulthood and was able to rescue the memory process in simple and complex DS mouse models.

The fact that ALGERNON, another DYRK1A ATP competitive inhibitor, could also rescue some DS phenotypes after in utero treatment, was encouraging [226]. In this study, the DS mouse model used was the Ts1Cje containing a triplicated region homologous to human chromosome 21, going from *Sod1* to *Mx1* [59], smaller than the ones in Ts65Dn or in Dp(16)1Yey. The authors demonstrated in vitro that DYRK1A phosphorylates CYCLIN D1, a protein required for progression through the G1 phase of the cell cycle, to induce its degradation. To support the hypothesis that DYRK1A hyperactivity in DS condition leads to an increased CYCLIN D1 degradation, they showed that a majority of DS-derived fibroblasts were in the G1 phase. They also showed that *Dyrk1A* knockdown with an siRNA in DS derived fibroblasts normalizes the population of cells in the G1 phase to euploid control levels. Moreover, in adult DS animals, ALGERNON increased the number of proliferating cells without affecting the rate of differentiation or number of differentiated cells compared with vehicle-treated. However, in a more interesting way, a shorter prenatal

treatment, done only from embryonic day (E)10 to E15 with 10 mg/kg, was able to rescue the thinning of two cortical structures observed in untreated Ts1Cje embryos: the cortical plate, which includes migrating and differentiating neurons, and the intermediate zone, which contains migrating neurons and axon tracts. Prenatal ALGERNON administration in this mouse model presents also interesting long-term effects, in particular the rescue of working memory deficit in Y-maze, the hippocampus-dependent spatial memory in a Barnes maze and the associative memory in the contextual fear conditioning. Even if the decreased hippocampal neurogenesis in adult's trisomic offspring persisted despite the treatment, this result indicates that only acting on DYRK1A overdosage during the early stages of development can correct cognitive phenotypes with long-term beneficial effects. These data also reinforce the idea that DYRK1A overdosage acts first during neurodevelopment and is central to DS neurologic deficits.

McElyea et al. [230] decided to focus on another feature of DS, the craniofacial abnormalities. All humans with DS exhibit dysmorphic cranio-facial phenotypes. These abnormalities take place during prenatal morphogenesis and growth. Interestingly, the Ts65Dn DS mouse model exhibits similar craniofacial dysmorphism as observed in newborns with DS. In order to show the implication of DYRK1A in this craniofacial phenotype, a treatment with EGCG (200 mg/kg EGCG) was done at E7 and E8 by oral gavage of pregnant Ts65Dn mice. This short treatment corrected some of the neural crest cell phenotypes at E9.5 like the first pharyngeal arch volume and NCC number, with some craniofacial correction lasting until adulthood while the overall mandibular phenotype was not significantly improved. Curiously, a longer treatment (E0 to E9), with a lower dose (0.124 g/mL EGCG in water), did not have the same corrective effect; in particular, there was no significant improvement in the number of NCC in the pharyngeal arch 1.

Stagni et al. (2016) investigated the short- and long-time effects of postnatal inhibition of DYRK1A. The inhibitory treatment was administrated to Ts65Dn mice from postnatal day (P)3 to P15 during peak granule cell neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus, with pure Sigma-Aldrich EGCG (25 mg/kg/day) [231]. The effect of the treatment was investigated immediately after the period of administration or at the age of 45 days, in order to detect possible long-term effects. At the cellular level and after the administration window, the authors reported that neonatal treatment with EGCG restored the number of neural precursor cells in two major brain neurogenic regions in trisomic model that are the sub-ventricular zone and sub-granular zone, without any effect on cell death. This led to an increase in total granule cell number reaching the disomic level. Surprisingly, the treatment had no effect in the euploid mice. They also found that the deficit in the number of proliferative cells in the Ts65Dn disappeared with the EGCG treatment. In the same way, EGCG restores the number of cells in the S-phase of the cell cycle. Because the neuronal circuit formation occurs in the early postnatal period, synapse development was also investigated. The levels of pre- and postsynaptic proteins in the dentate gyrus (DG), hippocampus and neocortex were decreased in Ts65Dn non-treated mice compared to the euploid non-treated mice and EGCG normalized these protein levels. Unfortunately, the treatment failed to induce long-term effects. When Ts65Dn mice treated with EGCG from P3–15 were examined at P45, there was no long-term improvement in neurogenesis. The proliferation rate of granule cell precursors, the number of granule neurons or the density of synaptic terminals in the hippocampus and neocortex were again impaired at 45 days of age. Memory performances were also evaluated at P45 to see if cognitive improvement of Ts65Dn mice could remain after a long period without treatment. Two hippocampal-dependent tasks were used, the working memory assessed in a Y-maze and the spatial reference memory assessed in the Morris water maze system. Both of them were not ameliorated. In addition, in treated Ts65Dn mice, a reduction in the number of BrdU-positive cells was observed compared to the Ts65Dn non-treated or euploid non-treated group of mice. There was also a reduction in granule cell numerical density in treated euploid mice. Even if no effect was noted in behavioral tests, these observations indicate potential aversive effects of the treatment.

These studies show that early prenatal (in utero) or antenatal treatment can lead to immediate correction of defects taking place during embryonic stages, whereas the sustainability of the effects does not always appear. Although many parameters differ between these studies, an obvious difference and surely of fundamental importance is the windows of treatment. Possibly because the treatment was given too late (after birth), it failed to produce long-term effect in the last study due to other alterations that are not compensated. In addition, we should be very careful with prenatal treatment. *Dyrk1a* is implicated in many primordial pathways and modifying its activity in a key period of development could lead to subtle impairments, undetectable in this simple animal model. The most prominent example is MRD7, a form of autism, due to a deficit in *Dyrk1a* gene dosage. Prenatal treatment should not mimic this deficit to avoid the apparition of deleterious phenotypes.

5. Conclusions

As discussed here, DYRK1A is a multipotent protein involved in several mechanisms during development and in adulthood (Figure). Many pieces of evidence have been collected over the last decades showing that DYRK1A overexpression is a major driver of cognitive phenotypes in DS and that DYRK1A controls the development of the brain and the function of the adult brain, notably at the glutamatergic synapses [52,117]. Several drugs have been developed with some success to reduce the hyperactivity of the kinase in DS and rescue the cognitive deficits in adults or after treatment in utero [230,231]. Changes in other domains have been investigated. Facial dysmorphology was improved in DS mouse models and also observed in young children treated with GTE-EGCG [230,232]. Nevertheless, Stringer et al. [215] stressed the negative effect on long bones development in treated mice. Recent studies pinpointed the consequences of treatment with EGCG in body composition and lipid metabolism in humans [233]. Interestingly, inhibitors of DYRK1A have been found to impact adipogenesis in a cellular differentiation model [222] and to promote the proliferation of pancreatic β -cells [225]. Most of the work done so far has considered that DYRK1A overdosage is constant during development and in adulthood. Nevertheless, it is clear from recent advances done with single cell analysis that the expression, and thus the overdosage of *Dyrk1a*, is not constant during mouse development. Thus, one will have to consider revisiting and refining the window of treatment for the embryonic development although no major defect was observed in mice when treated from conception to birth.

In addition, we should keep in our mind that reducing the DS etiology to the sole overdosage of DYRK1A is certainly not reasonable. DYRK1A is definitely not the only driver for DS phenotype. DS is a multigenic diseases with many overdosage genes, such as *Kcnj6* (*Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 6*), *App* (*Amyloid- β precursor protein*), (*Cystathionine β synthase*) and others, contributing to cognitive phenotypes [160,234,235]. Thus, controlling the DYRK1A kinase overactivity in DS should remind readers as a real proof-of-concept that improving the life of people with DS can be reached. Additional progress needs to be achieved first to fine-tune the correction of DYRK1A overdosage and to disentangle the complex genetic interactions that are found in DS models, involving DYRK1A and other Hsa21 genes.

Author Contributions: Writing—original draft preparation, V.B., H.A.-O., A.D. and Y.H.; writing—review and editing, V.B. and Y.H.; funding acquisition, Y.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the National Centre for Scientific Research (CNRS), the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM), the University of Strasbourg (Unistra), the French state funds through the “Agence Nationale de la Recherche” under the frame programme Investissements d’Avenir (ANR-10-IDEX-0002-02, ANR-10-LABX-0030-INRT, ANR-10-INBS-07 PHENOMIN to Y.H.). This project has received funding from the Jérôme Lejeune foundation and the European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement

GO-DS21 No 848077. The funders had no role in data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All the data used for this review are available as indicated in the text in online resource.

Acknowledgments: We would like to thank members of the research group from the IGBMC laboratory for the fruitful discussion.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Varjosalo, M.; Kesitalo, S.; Van Drogen, A.; Nurkkala, H.; Vichalkovski, A.; Aebersold, R.; Gstaiger, M. The protein interaction landscape of the human CMGC kinase group. *Cell Rep.* **2013**, *3*, 1306–1320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Garrett, S.; Broach, J. Loss of Ras activity in *Saccharomyces cerevisiae* is suppressed by disruptions of a new kinase gene, YAK1, whose product may act downstream of the cAMP-dependent protein kinase. *Genes Dev.* **1989**, *3*, 1336–1348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Tejedor, F.; Zhu, X.R.; Kaltenbach, E.; Ackermann, A.; Baumann, A.; Canal, I.; Heisenberg, M.; Fischbach, K.F.; Pongs, O. minibrain: A new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in *Drosophila*. *Neuron* **1995**, *14*, 287–301. [[CrossRef](#)]
4. Kinstrie, R.; Luebbering, N.; Miranda-Saavedra, D.; Sibbet, G.; Han, J.; Lochhead, P.A.; Cleghon, V. Characterization of a domain that transiently converts class 2 DYRKs into intramolecular tyrosine kinases. *Sci. Signal.* **2010**, *3*, ra16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Alvarez, M.; Estivill, X.; de la Luna, S. DYRK1A accumulates in splicing speckles through a novel targeting signal and induces speckle disassembly. *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 3099–3107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Alexeeva, M.; Åberg, E.; Engh, R.A.; Rothweiler, U. The structure of a dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A-PKC412 complex reveals disulfide-bridge formation with the anomalous catalytic loop HRD(HCD) cysteine. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2015**, *71*, 1207–1215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Anderson, K.; Chen, Y.; Chen, Z.; Dominique, R.; Glenn, K.; He, Y.; Janson, C.; Luk, K.C.; Lukacs, C.; Polonskaia, A.; et al. Pyrido[2,3-d]pyrimidines: Discovery and preliminary SAR of a novel series of DYRK1B and DYRK1A inhibitors. *Bioorgan. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 6610–6615. [[CrossRef](#)]
8. Falke, H.; Chaikuad, A.; Becker, A.; Loaëc, N.; Lozach, O.; Abu Jhaisha, S.; Becker, W.; Jones, P.G.; Preu, L.; Baumann, K.; et al. 10-iodo-11H-indolo[3,2-c]quinoline-6-carboxylic acids are selective inhibitors of DYRK1A. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 3131–3143. [[CrossRef](#)]
9. Ogawa, Y.; Nonaka, Y.; Goto, T.; Ohnishi, E.; Hiramatsu, T.; Kii, I.; Yoshida, M.; Ikura, T.; Onogi, H.; Shibuya, H.; et al. Development of a novel selective inhibitor of the Down syndrome-related kinase Dyrk1A. *Nat. Commun.* **2010**, *1*, 86. [[CrossRef](#)]
10. 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. 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. [[CrossRef](#)]
11. Soundararajan, M.; Roos, A.K.; Savitsky, P.; Filippakopoulos, P.; Kettenbach, A.N.; Olsen, J.V.; Gerber, S.A.; Eswaran, J.; Knapp, S.; Elkins, J.M. Structures of Down syndrome kinases, DYRKs, reveal mechanisms of kinase activation and substrate recognition. *Structure* **2013**, *21*, 986–996. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Rothweiler, U.; Stensen, W.; Brandsdal, B.O.; Isaksson, J.; Leeson, F.A.; Engh, R.A.; Svendsen, J.S. Probing the ATP-Binding Pocket of Protein Kinase DYRK1A with Benzothiazole Fragment Molecules. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 9814–9824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Okui, M.; Ide, T.; Morita, K.; Funakoshi, E.; Ito, F.; Ogita, K.; Yoneda, Y.; Kudoh, J.; Shimizu, N. High-level expression of the Mnb/Dyrk1A gene in brain and heart during rat early development. *Genomics* **1999**, *62*, 165–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Rahmani, Z.; Lopes, C.; Rachidi, M.; Delabar, J.M. Expression of the mnb (dyrk) protein in adult and embryonic mouse tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *253*, 514–518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Guimera, J.; Casas, C.; Estivill, X.; Pritchard, M. Human minibrain homologue (MNBH/DYRK1): Characterization, alternative splicing, differential tissue expression, and overexpression in Down syndrome. *Genomics* **1999**, *57*, 407–418. [[CrossRef](#)]

16. Guimerá, J.; Casas, C.; Pucharcòs, C.; Solans, A.; Domènech, A.; Planas, A.M.; Ashley, J.; Lovett, M.; Estivill, X.; Pritchard, M.A. A human homologue of *Drosophila* minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region. *Hum. Mol. Genet.* **1996**, *5*, 1305–1310. [[CrossRef](#)]
17. van Bon, B.W.; Coe, B.P.; Bernier, R.; Green, C.; Gerdts, J.; Witherspoon, K.; Kleefstra, T.; Willemsen, M.H.; Kumar, R.; Bosco, P.; et al. Disruptive de novo mutations of DYRK1A lead to a syndromic form of autism and ID. *Mol. Psychiatry* **2016**, *21*, 126–132. [[CrossRef](#)]
18. Hämmerle, B.; Elizalde, C.; Tejedor, F.J. The spatio-temporal and subcellular expression of the candidate Down syndrome gene *Mnb/Dyrk1A* in the developing mouse brain suggests distinct sequential roles in neuronal development. *Eur. J. Neurosci.* **2008**, *27*, 1061–1074. [[CrossRef](#)]
19. Hammerle, B.; Carnicero, A.; Elizalde, C.; Ceron, J.; Martinez, S.; Tejedor, F.J. Expression patterns and subcellular localization of the Down syndrome candidate protein MNB/DYRK1A suggest a role in late neuronal differentiation. *Eur. J. Neurosci.* **2003**, *17*, 2277–2286. [[CrossRef](#)]
20. Marti, E.; Altafaj, X.; Dierssen, M.; de la Luna, S.; Fotaki, V.; Alvarez, M.; Perez-Riba, M.; Ferrer, I.; Estivill, X. *Dyrk1A* expression pattern supports specific roles of this kinase in the adult central nervous system. *Brain Res.* **2003**, *964*, 250–263. [[CrossRef](#)]
21. Wegiel, J.; Kuchna, I.; Nowicki, K.; Frackowiak, J.; Dowjat, K.; Silverman, W.P.; Reisberg, B.; DeLeon, M.; Wisniewski, T.; Adayev, T.; et al. Cell type- and brain structure-specific patterns of distribution of minibrain kinase in human brain. *Brain Res.* **2004**, *1010*, 69–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Maenz, B.; Hekerman, P.; Vela, E.M.; Galceran, J.; Becker, W. Characterization of the human DYRK1A promoter and its regulation by the transcription factor E2F1. *BMC Mol. Biol.* **2008**, *9*, 30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Lu, M.; Zheng, L.; Han, B.; Wang, L.; Wang, P.; Liu, H.; Sun, X. REST Regulates DYRK1A Transcription in a Negative Feedback Loop. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 10755–10763. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Liu, W.; Zhou, H.; Liu, L.; Zhao, C.; Deng, Y.; Chen, L.; Wu, L.; Mandrycky, N.; McNabb, C.T.; Peng, Y.; et al. Disruption of neurogenesis and cortical development in transgenic mice misexpressing *Olig2*, a gene in the Down syndrome critical region. *Neurobiol. Dis.* **2015**, *77*, 106–116. [[CrossRef](#)]
25. Chakrabarti, L.; Best, T.K.; Cramer, N.P.; Carney, R.S.E.; Isaac, J.T.R.; Galdzicki, Z.; Haydar, T.F. *Olig1* and *Olig2* triplication causes developmental brain defects in Down syndrome. *Nat. Neurosci.* **2010**, *13*, 927–934. [[CrossRef](#)]
26. Vidaki, M.; Drees, F.; Saxena, T.; Lanslots, E.; Taliaferro, M.J.; Tatarakis, A.; Burge, C.B.; Wang, E.T.; Gertler, F.B. A Requirement for Mena, an Actin Regulator, in Local mRNA Translation in Developing Neurons. *Neuron* **2017**, *95*, 608–622. [[CrossRef](#)]
27. Maier, B.; Gluba, W.; Bernier, B.; Turner, T.; Mohammad, K.; Guise, T.; Sutherland, A.; Thorner, M.; Scrabble, H. Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev.* **2004**, *18*, 306–319. [[CrossRef](#)]
28. Pehar, M.; O’Riordan, K.J.; Burns-Cusato, M.; Andrzejewski, M.E.; del Alcazar, C.G.; Burger, C.; Scrabble, H.; Puglielli, L. Altered longevity-assurance activity of p53:p44 in the mouse causes memory loss, neurodegeneration and premature death. *Aging Cell* **2010**, *9*, 174–190. [[CrossRef](#)]
29. Pehar, M.; Ko, M.H.; Li, M.; Scrabble, H.; Puglielli, L. P44, the ‘longevity-assurance’ isoform of P53, regulates tau phosphorylation and is activated in an age-dependent fashion. *Aging Cell* **2014**, *13*, 449–456. [[CrossRef](#)]
30. Park, J.; Oh, Y.; Yoo, L.; Jung, M.S.; Song, W.J.; Lee, S.H.; Seo, H.; Chung, K.C. *Dyrk1A* phosphorylates p53 and inhibits proliferation of embryonic neuronal cells. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 31895–31906. [[CrossRef](#)]
31. Zhang, Y.; Liao, J.M.; Zeng, S.X.; Lu, H. p53 downregulates Down syndrome-associated DYRK1A through miR-1246. *EMBO Rep.* **2011**, *12*, 811–817. [[CrossRef](#)]
32. da Costa Martins, P.A.; Salic, K.; Gladka, M.M.; Armand, A.S.; Leptidis, S.; el Azzouzi, H.; Hansen, A.; Coenen-de Roo, C.J.; Bierhuizen, M.F.; van der Nagel, R.; et al. MicroRNA-199b targets the nuclear kinase *Dyrk1a* in an auto-amplification loop promoting calcineurin/NFAT signalling. *Nat. Cell Biol.* **2010**, *12*, 1220–1227. [[CrossRef](#)]
33. Chiu, C.C.; Yeh, T.H.; Chen, R.S.; Chen, H.C.; Huang, Y.Z.; Weng, Y.H.; Cheng, Y.C.; Liu, Y.C.; Cheng, A.J.; Lu, Y.C.; et al. Upregulated Expression of MicroRNA-204-5p Leads to the Death of Dopaminergic Cells by Targeting DYRK1A-Mediated Apoptotic Signaling Cascade. *Front. Cell Neurosci.* **2019**, *13*, 399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Göckler, N.; Jofre, G.; Papadopoulos, C.; Soppa, U.; Tejedor, F.J.; Becker, W. Harmine specifically inhibits protein kinase DYRK1A and interferes with neurite formation. *FEBS J.* **2009**, *276*, 6324–6337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Himpel, S.; Panzer, P.; Eirnbter, K.; Czajkowska, H.; Sayed, M.; Packman, L.C.; Blundell, T.; Kentrup, H.; Grötzing, J.; Joost, H.G.; et al. Identification of the autophosphorylation sites and characterization of their effects in the protein kinase DYRK1A. *Biochem. J.* **2001**, *359*, 497–505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Adayev, T.; Chen-Hwang, M.C.; Murakami, N.; Lee, E.; Bolton, D.C.; Hwang, Y.W. Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A does not require tyrosine phosphorylation for activity in vitro. *Biochemistry* **2007**, *46*, 7614–7624. [[CrossRef](#)]
37. Lochhead, P.A.; Sibbet, G.; Morrice, N.; Cleghon, V. Activation-loop autophosphorylation is mediated by a novel transitional intermediate form of DYRKs. *Cell* **2005**, *121*, 925–936. [[CrossRef](#)]
38. Walte, A.; Rübén, K.; Birner-Gruenberger, R.; Preisinger, C.; Bamberg-Lemper, S.; Hilz, N.; Bracher, F.; Becker, W. Mechanism of dual specificity kinase activity of DYRK1A. *FEBS J.* **2013**, *280*, 4495–4511. [[CrossRef](#)]
39. Kii, I.; Sumida, Y.; Goto, T.; Sonamoto, R.; Okuno, Y.; Yoshida, S.; Kato-Sumida, T.; Koike, Y.; Abe, M.; Nonaka, Y.; et al.

- Selective inhibition of the kinase DYRK1A by targeting its folding process. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11391. [[CrossRef](#)]
39. Alvarez, M.; Altafaj, X.; Aranda, S.; de la Luna, S. DYRK1A autophosphorylation on serine residue 520 modulates its kinase activity via 14-3-3 binding. *Mol. Biol. Cell* **2007**, *18*, 1167–1178. [[CrossRef](#)]
 40. Park, J.; Song, W.J.; Chung, K.C. Function and regulation of Dyrk1A: Towards understanding Down syndrome. *Cell Mol. Life Sci.* **2009**, *66*, 3235–3240. [[CrossRef](#)]
 41. Kida, E.; Walus, M.; Jarza, bek, K.; Palmiello, S.; Albertini, G.; Rabe, A.; Hwang, Y.W.; Golabek, A.A. Form of dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation-regulated kinase 1A nonphosphorylated at tyrosine 145 and 147 is enriched in the nuclei of astroglial cells, adult hippocampal progenitors, and some cholinergic axon terminals. *Neuroscience* **2011**, *195*, 112–127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 42. Li, D.; Jackson, R.A.; Yusoff, P.; Guy, G.R. Direct association of Sprouty-related protein with an EVH1 domain (SPRED) 1 or SPRED2 with DYRK1A modifies substrate/kinase interactions. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 35374–35385. [[CrossRef](#)]
 43. Yang, E.J.; Ahn, Y.S.; Chung, K.C. Protein kinase Dyrk1 activates cAMP response element-binding protein during neuronal differentiation in hippocampal progenitor cells. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 39819–39824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 44. Tschöp, K.; Conery, A.R.; Litovchick, L.; Decaprio, J.A.; Settleman, J.; Harlow, E.; Dyson, N. A kinase shRNA screen links LATS2 and the pRB tumor suppressor. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 814–830. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 45. Lee, Y.H.; Im, E.; Hyun, M.; Park, J.; Chung, K.C. Protein phosphatase PPM1B inhibits DYRK1A kinase through dephosphorylation of pS258 and reduces toxic tau aggregation. *J. Biol. Chem.* **2021**, *296*, 100245. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 46. Jin, N.; Yin, X.; Gu, J.; Zhang, X.; Shi, J.; Qian, W.; Ji, Y.; Cao, M.; Gu, X.; Ding, F.; et al. Truncation and Activation of Dual Specificity Tyrosine Phosphorylation-regulated Kinase 1A by Calpain I: A molecular mechanism linked to tau pathology in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 15219–15237. [[CrossRef](#)]
 47. Souchet, B.; Audrain, M.; Billard, J.M.; Dairou, J.; Fol, R.; Orefice, N.S.; Tada, S.; Gu, Y.; Dufayet-Chaffaud, G.; Limanton, E.; et al. Inhibition of DYRK1A proteolysis modifies its kinase specificity and rescues Alzheimer phenotype in APP/PS1 mice. *Acta Neuropathol. Commun.* **2019**, *7*, 46. [[CrossRef](#)]
 48. Liu, Q.; Tang, Y.; Chen, L.; Liu, N.; Lang, F.; Liu, H.; Wang, P.; Sun, X. E3 Ligase SCF β TrCP-induced DYRK1A Protein Degradation Is Essential for Cell Cycle Progression in HEK293 Cells. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 26399–26409. [[CrossRef](#)]
 49. Becker, W.; Weber, Y.; Wetzell, K.; Eirmbter, K.; Tejedor, F.J.; Joost, H.G. Sequence characteristics, subcellular localization, and substrate specificity of DYRK-related kinases, a novel family of dual specificity protein kinases. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 25893–25902. [[CrossRef](#)]
 50. Aranda, S.; Alvarez, M.; Turró, S.; Laguna, A.; de la Luna, S. Sprouty2-mediated inhibition of fibroblast growth factor signaling is modulated by the protein kinase DYRK1A. *Mol. Cell Biol.* **2008**, *28*, 5899–5911. [[CrossRef](#)]
 51. Nguyen, T.L.; Duchon, A.; Manousopoulou, A.; Loaïc, N.; Villiers, B.; Pani, G.; Karatas, M.; Mechling, A.E.; Harsan, L.A.; Limanton, E.; et al. Correction of cognitive deficits in mouse models of Down syndrome by a pharmacological inhibitor of DYRK1A. *Dis. Models Mech.* **2018**, *11*. [[CrossRef](#)]
 52. Miyata, Y.; Shibata, T.; Aoshima, M.; Tsubata, T.; Nishida, E. The molecular chaperone TRIC/CCT binds to the Trp-Asp 40 (WD40) repeat protein WDR68 and promotes its folding, protein kinase DYRK1A binding, and nuclear accumulation. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 33320–33332. [[CrossRef](#)]
 53. Miyata, Y.; Nishida, E. DYRK1A binds to an evolutionarily conserved WD40-repeat protein WDR68 and induces its nuclear translocation. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1813*, 1728–1739. [[CrossRef](#)]
 54. Bescond, M.; Rahmani, Z. Dual-specificity tyrosine-phosphorylated and regulated kinase 1A (DYRK1A) interacts with the phytanoyl-CoA alpha-hydroxylase associated protein 1 (PAHX-AP1), a brain specific protein. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2005**, *37*, 775–783. [[CrossRef](#)]
 55. Kaczmarek, W.; Barua, M.; Mazur-Kolecka, B.; Frackowiak, J.; Dowjat, W.; Mehta, P.; Bolton, D.; Hwang, Y.W.; Rabe, A.; Albertini, G.; et al. Intracellular distribution of differentially phosphorylated dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A). *J. Neurosci. Res.* **2014**, *92*, 162–173. [[CrossRef](#)]
 56. Smith, D.J.; Zhu, Y.W.; Zhang, J.L.; Cheng, J.F.; Rubin, E.M. Construction of a panel of transgenic mice containing a contiguous 2-Mb set of YAC/P1 clones from human chromosome 21q22.2. *Genomics* **1995**, *27*, 425–434. [[CrossRef](#)]
 57. Altafaj, X.; Dierssen, M.; Baamonde, C.; Marti, E.; Visa, J.; Guimera, J.; Oset, M.; Gonzalez, J.R.; Florez, J.; Fillat, C.; et al. Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing Dyrk1A (minibrain), a murine model of Down's syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **2001**, *10*, 1915–1923. [[CrossRef](#)]
 58. Sago, H.; Carlson, E.J.; Smith, D.J.; Kilbridge, J.; Rubin, E.M.; Mobley, W.C.; Epstein, C.J.; Huang, T.T. Ts1Cje, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6256–6261. [[CrossRef](#)]
 59. Arranz, J.; Balducci, E.; Arató, K.; Sánchez-Elexpuru, G.; Najas, S.; Parras, A.; Rebollo, E.; Pijuan, I.; Erb, I.; Verde, G.; et al. Impaired development of neocortical circuits contributes to the neurological alterations in DYRK1A haploinsufficiency syndrome. *Neurobiol. Dis.* **2019**, *127*, 210–222. [[CrossRef](#)]
 60. Sitz, J.H.; Tigges, M.; Baumgärtel, K.; Khaspekov, L.G.; Lutz, B. Dyrk1A potentiates steroid hormone-induced transcription via the chromatin remodeling factor Arip4. *Mol. Cell Biol.* **2004**, *24*, 5821–5834. [[CrossRef](#)]
 61. Kung, J.E.; Jura, N. Structural Basis for the Non-catalytic Functions of Protein Kinases. *Structure* **2016**, *24*, 7–24. [[CrossRef](#)]
 62. Himpel, S.; Tegge, W.; Frank, R.; Leder, S.; Joost, H.G.; Becker, W. Specificity determinants of substrate recognition by

- the protein kinase DYRK1A. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 2431–2438. [[CrossRef](#)]
63. Ryoo, S.R.; Jeong, H.K.; Radnaabazar, C.; Yoo, J.J.; Cho, H.J.; Lee, H.W.; Kim, I.S.; Cheon, Y.H.; Ahn, Y.S.; Chung, S.H.; et al. DYRK1A-mediated hyperphosphorylation of Tau. A functional link between Down syndrome and Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 34850–34857. [[CrossRef](#)]
 64. Liu, F.; Liang, Z.; Wegiel, J.; Hwang, Y.W.; Iqbal, K.; Grundke-Iqbal, I.; Ramakrishna, N.; Gong, C.X. Overexpression of Dyrk1A contributes to neurofibrillary degeneration in Down syndrome. *FASEB J.* **2008**, *22*, 3224–3233. [[CrossRef](#)]
 65. Murakami, N.; Xie, W.; Lu, R.C.; Chen-Hwang, M.C.; Wieraszko, A.; Hwang, Y.W. Phosphorylation of amphiphysin I by minibrain kinase/dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase, a kinase implicated in Down syndrome. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 23712–23724. [[CrossRef](#)]
 66. Seifert, A.; Clarke, P.R. p38alpha- and DYRK1A-dependent phosphorylation of caspase-9 at an inhibitory site in response to hyperosmotic stress. *Cell Signal.* **2009**, *21*, 1626–1633. [[CrossRef](#)]
 67. de Graaf, K.; Czajkowska, H.; Rottmann, S.; Packman, L.C.; Lilischkis, R.; Lüscher, B.; Becker, W. The protein kinase DYRK1A phosphorylates the splicing factor SF3b1/SAP155 at Thr434, a novel in vivo phosphorylation site. *BMC Biochem.* **2006**, *7*, 7. [[CrossRef](#)]
 68. Kim, E.J.; Sung, J.Y.; Lee, H.J.; Rhim, H.; Hasegawa, M.; Iwatsubo, T.; Min, d.S.; Kim, J.; Paik, S.R.; Chung, K.C. Dyrk1A phosphorylates alpha-synuclein and enhances intracellular inclusion formation. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 33250–33257. [[CrossRef](#)]
 69. Becker, W. Emerging role of DYRK family protein kinases as regulators of protein stability in cell cycle control. *Cell Cycle* **2012**, *11*, 3389–3394. [[CrossRef](#)]
 70. 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. Truncation of the Down syndrome candidate gene DYRK1A in two unrelated patients with microcephaly. *Am. J. Hum. Genet.* **2008**, *82*, 1165–1170. [[CrossRef](#)]
 71. Courcet, J.B.; Favier, L.; Malzac, P.; Masurel-Paulet, A.; Lopez, E.; Callier, P.; Lambert, L.; Lemesle, M.; Thevenon, J.; Gigot, N.; et al. The DYRK1A gene is a cause of syndromic intellectual disability with severe microcephaly and epilepsy. *J. Med. Genet.* **2012**, *49*, 731–736. [[CrossRef](#)]
 72. van Bon, B.W.; Hoischen, A.; Hehir-Kwa, J.; de Brouwer, A.P.; Ruivenkamp, C.; Gijsbers, A.C.; Marcelis, C.L.; de Leeuw, N.; Veltman, J.A.; Brunner, H.G.; et al. Intragenic deletion in DYRK1A leads to mental retardation and primary microcephaly. *Clin. Genet.* **2011**, *79*, 296–299. [[CrossRef](#)]
 73. Fotaki, V.; Dierssen, M.; Alcántara, S.; Martínez, S.; Martí, E.; Casas, C.; Visa, J.; Soriano, E.; Estivill, X.; Arbones, M.L. Dyrk1A haploinsufficiency affects viability and causes developmental delay and abnormal brain morphology in mice. *Mol. Cell Biol.* **2002**, *22*, 6636–6647. [[CrossRef](#)]
 74. Tejedor, F.J.; Hämmerle, B. MNB/DYRK1A as a multiple regulator of neuronal development. *FEBS J.* **2011**, *278*, 223–235. [[CrossRef](#)]
 75. Yabut, O.; Domogauer, J.; D’Arcangelo, G. Dyrk1A overexpression inhibits proliferation and induces premature neuronal differentiation of neural progenitor cells. *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 4004–4014. [[CrossRef](#)]
 76. Contestabile, A.; Fila, T.; Ceccarelli, C.; Bonasoni, P.; Bonapace, L.; Santini, D.; Bartesaghi, R.; Ciani, E. Cell cycle alteration and decreased cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus and in the neocortical germinal matrix of fetuses with Down syndrome and in Ts65Dn mice. *Hippocampus* **2007**, *17*, 665–678. [[CrossRef](#)]
 77. Larsen, K.B.; Laursen, H.; Graem, N.; Samuelsen, G.B.; Bogdanovic, N.; Pakkenberg, B. Reduced cell number in the neocortical part of the human fetal brain in Down syndrome. *Ann. Anat.* **2008**, *190*, 421–427. [[CrossRef](#)]
 78. Hämmerle, B.; Ulin, E.; Guimera, J.; Becker, W.; Guillemot, F.; Tejedor, F.J. Transient expression of Mnb/Dyrk1a couples cell cycle exit and differentiation of neuronal precursors by inducing p27KIP1 expression and suppressing NOTCH signaling. *Development* **2011**, *138*, 2543–2554. [[CrossRef](#)]
 79. Soppa, U.; Schumacher, J.; Florencio Ortiz, V.; Pasqualon, T.; Tejedor, F.J.; Becker, W. The Down syndrome-related protein kinase DYRK1A phosphorylates p27(Kip1) and Cyclin D1 and induces cell cycle exit and neuronal differentiation. *Cell Cycle* **2014**, *13*, 2084–2100. [[CrossRef](#)]
 80. Shaikh, M.N.; Gutierrez-Avino, F.; Colonques, J.; Ceron, J.; Hammerle, B.; Tejedor, F.J. Minibrain drives the Dacapo-dependent cell cycle exit of neurons in the Drosophila brain by promoting asense and prospero expression. *Development* **2016**, *143*, 3195–3205. [[CrossRef](#)]
 81. Chen, J.Y.; Lin, J.R.; Tsai, F.C.; Meyer, T. Dosage of Dyrk1a shifts cells within a p21-cyclin D1 signaling map to control the decision to enter the cell cycle. *Mol. Cell* **2013**, *52*, 87–100. [[CrossRef](#)]
 82. Litovchick, L.; Florens, L.A.; Swanson, S.K.; Washburn, M.P.; DeCaprio, J.A. DYRK1A protein kinase promotes quiescence and senescence through DREAM complex assembly. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 801–813. [[CrossRef](#)]
 83. Levy, J.A.; LaFlamme, C.W.; Tsapralis, G.; Crynen, G.; Page, D.T. Dyrk1a Mutations Cause Undergrowth of Cortical Pyramidal Neurons via Dysregulated Growth Factor Signaling. *Biol. Psychiatry* **2021**, *90*, 295–306. [[CrossRef](#)]
 84. Najas, S.; Arranz, J.; Lochhead, P.A.; Ashford, A.L.; Oxley, D.; Delabar, J.M.; Cook, S.J.; Barallobre, M.J.; Arbonés, M.L. DYRK1A-mediated Cyclin D1 Degradation in Neural Stem Cells Contributes to the Neurogenic Cortical Defects in Down Syndrome. *EBioMedicine* **2015**, *2*, 120–134. [[CrossRef](#)]
 85. de Graaf, K.; Hekerman, P.; Spelten, O.; Herrmann, A.; Packman, L.C.; Büssow, K.; Müller-Newen, G.; Becker, W. Characterization of cyclin L2, a novel cyclin with an arginine/serine-rich domain: Phosphorylation by DYRK1A and colocalization with splicing factors. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 4612–4624. [[CrossRef](#)]

86. Kinstrie, R.; Lochhead, P.A.; Sibbet, G.; Morrice, N.; Cleghon, V. dDYRK2 and Minibrain interact with the chromatin remodelling factors SNR1 and TRX. *Biochem. J.* **2006**, *398*, 45–54. [[CrossRef](#)]
87. Kelly, P.A.; Rahmani, Z. DYRK1A enhances the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells by forming a complex with Ras, B-Raf, and MEK1. *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 3562–3573. [[CrossRef](#)]
88. Mao, J.; Maye, P.; Kogerman, P.; Tejedor, F.J.; Toftgard, R.; Xie, W.; Wu, G.; Wu, D. Regulation of Gli1 transcriptional activity in the nucleus by Dyrk1. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 35156–35161. [[CrossRef](#)]
89. Ehe, B.K.; Lamson, D.R.; Tarpley, M.; Onyenwoke, R.U.; Graves, L.M.; Williams, K.P. Identification of a DYRK1A-mediated phosphorylation site within the nuclear localization sequence of the hedgehog transcription factor GLI1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *491*, 767–772. [[CrossRef](#)]
90. Fernandez-Martinez, J.; Vela, E.M.; Tora-Ponsioen, M.; Ocaña, O.H.; Nieto, M.A.; Galceran, J. Attenuation of Notch signalling by the Down-syndrome-associated kinase DYRK1A. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 1574–1583. [[CrossRef](#)]
91. Skurat, A.V.; Dietrich, A.D. Phosphorylation of Ser640 in muscle glycogen synthase by DYRK family protein kinases. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 2490–2498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Woods, Y.L.; Rena, G.; Morrice, N.; Barthel, A.; Becker, W.; Guo, S.; Unterman, T.G.; Cohen, P. The kinase DYRK1A phosphorylates the transcription factor FKHR at Ser329 in vitro, a novel in vivo phosphorylation site. *Biochem. J.* **2001**, *355*, 597–607. [[CrossRef](#)]
93. Scales, T.M.; Lin, S.; Kraus, M.; Goold, R.G.; Gordon-Weeks, P.R. Nonprimed and DYRK1A-primed GSK3 beta-phosphorylation sites on MAP1B regulate microtubule dynamics in growing axons. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 2424–2435. [[CrossRef](#)]
94. Tatebe, H.; Nakano, K.; Maximo, R.; Shiozaki, K. Pom1 DYRK regulates localization of the Rga4 GAP to ensure bipolar activation of Cdc42 in fission yeast. *Curr. Biol.* **2008**, *18*, 322–330. [[CrossRef](#)]
95. Park, J.; Sung, J.Y.; Song, W.J.; Chang, S.; Chung, K.C. Dyrk1A negatively regulates the actin cytoskeleton through threonine phosphorylation of N-WASP. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 67–80. [[CrossRef](#)]
96. Abekhouk, S.; Planque, C.; Ripoll, C.; Urbaniak, P.; Paul, J.L.; Delabar, J.M.; Janel, N. Dyrk1A, a serine/threonine kinase, is involved in ERK and Akt activation in the brain of hyperhomocysteinemic mice. *Mol. Neurobiol.* **2013**, *47*, 105–116. [[CrossRef](#)]
97. Shin, J.H.; Guedj, F.; Delabar, J.M.; Lubec, G. Dysregulation of growth factor receptor-bound protein 2 and fascin in hippocampus of mice polytransgenic for chromosome 21 structures. *Hippocampus* **2007**, *17*, 1180–1192. [[CrossRef](#)]
98. Park, J.; Oh, Y.; Chung, K.C. Two key genes closely implicated with the neuropathological characteristics in Down syndrome: DYRK1A and RCAN1. *BMB Rep.* **2009**, *42*, 6–15. [[CrossRef](#)]
99. Gwack, Y.; Sharma, S.; Nardone, J.; Tanasa, B.; Iuga, A.; Srikanth, S.; Okamura, H.; Bolton, D.; Feske, S.; Hogan, P.G.; et al. A genome-wide Drosophila RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* **2006**, *441*, 646–650. [[CrossRef](#)]
100. 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. NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature* **2006**, *441*, 595–600. [[CrossRef](#)]
101. Lee, Y.; Ha, J.; Kim, H.J.; Kim, Y.S.; Chang, E.J.; Song, W.J.; Kim, H.H. Negative feedback inhibition of NFATc1 by DYRK1A regulates bone homeostasis. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 33343–33351. [[CrossRef](#)]
102. Song, W.J.; Song, E.A.; Choi, S.H.; Baik, H.H.; Jin, B.K.; Kim, J.H.; Chung, S.H. Dyrk1A-mediated phosphorylation of RCAN1 promotes the formation of insoluble RCAN1 aggregates. *Neurosci. Lett.* **2013**, *554*, 135–140. [[CrossRef](#)]
103. Jung, M.S.; Park, J.H.; Ryu, Y.S.; Choi, S.H.; Yoon, S.H.; Kwon, M.Y.; Oh, J.Y.; Song, W.J.; Chung, S.H. Regulation of RCAN1 protein activity by Dyrk1A protein-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 40401–40412. [[CrossRef](#)]
104. Di Vona, C.; Bezdán, D.; Islam, A.B.; Salichs, E.; López-Bigas, N.; Ossowski, S.; de la Luna, S. Chromatin-wide profiling of DYRK1A reveals a role as a gene-specific RNA polymerase II CTD kinase. *Mol. Cell* **2015**, *57*, 506–520. [[CrossRef](#)]
105. Chen-Hwang, M.C.; Chen, H.R.; Elzinga, M.; Hwang, Y.W. Dynamin is a minibrain kinase/dual specificity Yak1-related kinase 1A substrate. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 17597–17604. [[CrossRef](#)]
106. Murakami, N.; Bolton, D.C.; Kida, E.; Xie, W.; Hwang, Y.W. Phosphorylation by Dyrk1A of clathrin coated vesicle-associated proteins: Identification of the substrate proteins and the effects of phosphorylation. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e34845. [[CrossRef](#)]
107. Huang, Y.; Chen-Hwang, M.C.; Dolios, G.; Murakami, N.; Padovan, J.C.; Wang, R.; Hwang, Y.W. Mnb/Dyrk1A phosphorylation regulates the interaction of dynamin 1 with SH3 domain-containing proteins. *Biochemistry* **2004**, *43*, 10173–10185. [[CrossRef](#)]
108. Murakami, N.; Bolton, D.; Hwang, Y.W. Dyrk1A binds to multiple endocytic proteins required for formation of clathrin-coated vesicles. *Biochemistry* **2009**, *48*, 9297–9305. [[CrossRef](#)]
109. Adayev, T.; Chen-Hwang, M.C.; Murakami, N.; Wang, R.; Hwang, Y.W. MNB/DYRK1A phosphorylation regulates the interactions of synaptojanin 1 with endocytic accessory proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *351*, 1060–1065. [[CrossRef](#)]
110. Chen, C.K.; Bregere, C.; Paluch, J.; Lu, J.F.; Dickman, D.K.; Chang, K.T. Activity-dependent facilitation of Synaptojanin and synaptic vesicle recycling by the Minibrain kinase. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Song, W.J.; Song, E.A.; Jung, M.S.; Choi, S.H.; Baik, H.H.; Jin, B.K.; Kim, J.H.; Chung, S.H. Phosphorylation and

- inactivation of glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) by dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (Dyrk1A). *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 2321–2333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Ori-McKenney, K.M.; McKenney, R.J.; Huang, H.H.; Li, T.; Meltzer, S.; Jan, L.Y.; Vale, R.D.; Wiita, A.P.; Jan, Y.N. Phosphorylation of β -Tubulin by the Down Syndrome Kinase, Minibrain/DYRK1a, Regulates Microtubule Dynamics and Dendrite Morphogenesis. *Neuron* **2016**, *90*, 551–563. [[CrossRef](#)]
 113. Park, J.H.; Jung, M.S.; Kim, Y.S.; Song, W.J.; Chung, S.H. Phosphorylation of Munc18-1 by Dyrk1A regulates its interaction with Syntaxin 1 and X11 α . *J. Neurochem.* **2012**, *122*, 1081–1091. [[CrossRef](#)]
 114. Altafaj, X.; Ortiz-Abalia, J.; Fernández, M.; Potier, M.C.; Laffaire, J.; Andreu, N.; Dierssen, M.; González-García, C.; Ceña, V.; Martí, E.; et al. Increased NR2A expression and prolonged decay of NMDA-induced calcium transient in cerebellum of TgDyrk1A mice, a mouse model of Down syndrome. *Neurobiol. Dis.* **2008**, *32*, 377–384. [[CrossRef](#)]
 115. Grau, C.; Arató, K.; Fernández-Fernández, J.M.; Valderrama, A.; Sindreu, C.; Fillat, C.; Ferrer, I.; de la Luna, S.; Altafaj, X. DYRK1A-mediated phosphorylation of GluN2A at Ser(1048) regulates the surface expression and channel activity of GluN1/GluN2A receptors. *Front. Cell Neurosci.* **2014**, *8*, 331. [[CrossRef](#)]
 116. Brault, V.; Nguyen, T.L.; Flores-Gutiérrez, J.; Iacono, G.; Birling, M.C.; Lalanne, V.; Meziane, H.; Manousopoulou, A.; Pavlovic, G.; Lindner, L.; et al. Dyrk1a gene dosage in glutamatergic neurons has key effects in cognitive deficits observed in mouse models of MRD7 and Down syndrome. *PLoS Genet.* **2021**, *17*, e1009777. [[CrossRef](#)]
 117. Souchet, B.; Guedj, F.; Sahun, I.; Duchon, A.; Daubigny, F.; Badel, A.; Yanagawa, Y.; Jose Barallobre, M.; Dierssen, M.; Yu, E.; et al. Excitation/inhibition balance and learning are modified by Dyrk1a gene dosage. *Neurobiol. Dis.* **2014**, *69*, 65–75. [[CrossRef](#)]
 118. Lepagnol-Bestel, A.; Zvara, A.; Maussion, G.; Quignon, F.; Ngimbous, B.; Ramoz, N.; Imbeaud, S.; Loe-Mie, Y.; Benihoud, K.; Agier, N.; et al. DYRK1A interacts with the REST/NRSF-SWI/SNF chromatin remodelling complex to deregulate gene clusters involved in the neuronal phenotypic traits of Down syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **2009**, *18*, 1405–1414. [[CrossRef](#)]
 119. Jang, S.M.; Azebi, S.; Soubigou, G.; Muchardt, C. DYRK1A phosphorylates histone H3 to differentially regulate the binding of HP1 isoforms and antagonize HP1-mediated transcriptional repression. *EMBO Rep.* **2014**, *15*, 686–694. [[CrossRef](#)]
 120. 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. Increased dosage of Dyrk1A alters alternative splicing factor (ASF)-regulated alternative splicing of tau in Down syndrome. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 28660–28669. [[CrossRef](#)]
 121. Ding, S.; Shi, J.; Qian, W.; Iqbal, K.; Grundke-Iqbal, I.; Gong, C.X.; Liu, F. Regulation of alternative splicing of tau exon 10 by 9G8 and Dyrk1A. *Neurobiol. Aging* **2012**, *33*, 1389–1399. [[CrossRef](#)]
 122. Qian, W.; Liang, H.; Shi, J.; Jin, N.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Gong, C.X.; Liu, F. Regulation of the alternative splicing of tau exon 10 by SC35 and Dyrk1A. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 6161–6171. [[CrossRef](#)]
 123. Yin, X.; Jin, N.; Gu, J.; Shi, J.; Zhou, J.; Gong, C.X.; Iqbal, K.; Grundke-Iqbal, I.; Liu, F. Dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (Dyrk1A) modulates serine/arginine-rich protein 55 (SRp55)-promoted Tau exon 10 inclusion. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 30497–30506. [[CrossRef](#)]
 124. Guard, S.E.; Poss, Z.C.; Ebmeier, C.C.; Pagratis, M.; Simpson, H.; Taatjes, D.J.; Old, W.M. The nuclear interactome of DYRK1A reveals a functional role in DNA damage repair. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 6539. [[CrossRef](#)]
 125. Menon, V.R.; Ananthapadmanabhan, V.; Swanson, S.; Saini, S.; Sesay, F.; Yakovlev, V.; Florens, L.; DeCaprio, J.A.; Washburn, M.P.; Dozmorov, M.; et al. DYRK1A regulates the recruitment of 53BP1 to the sites of DNA damage in part through interaction with RNF169. *Cell Cycle* **2019**, *18*, 531–551. [[CrossRef](#)]
 126. Roewenstrunk, J.; Di Vona, C.; Chen, J.; Borrás, E.; Dong, C.; Arató, K.; Sabidó, E.; Huen, M.S.Y.; de la Luna, S. A comprehensive proteomics-based interaction screen that links DYRK1A to RNF169 and to the DNA damage response. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 6014. [[CrossRef](#)]
 127. Woods, Y.L.; Cohen, P.; Becker, W.; Jakes, R.; Goedert, M.; Wang, X.; Proud, C.G. The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2Bepsilon at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212: Potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase. *Biochem. J.* **2001**, *355*, 609–615. [[CrossRef](#)]
 128. Park, J.; Yang, E.J.; Yoon, J.H.; Chung, K.C. Dyrk1A overexpression in immortalized hippocampal cells produces the neuropathological features of Down syndrome. *Mol. Cell Neurosci.* **2007**, *36*, 270–279. [[CrossRef](#)]
 129. Ryoo, S.R.; Cho, H.J.; Lee, H.W.; Jeong, H.K.; Radnaabazar, C.; Kim, Y.S.; Kim, M.J.; Son, M.Y.; Seo, H.; Chung, S.H.; et al. Dual-specificity tyrosine(Y)-phosphorylation regulated kinase 1A-mediated phosphorylation of amyloid precursor protein: Evidence for a functional link between Down syndrome and Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **2008**, *104*, 1333–1344. [[CrossRef](#)]
 130. Vingtdoux, V.; Hamdane, M.; Gompel, M.; Bégard, S.; Drobecq, H.; Ghestem, A.; Grosjean, M.E.; Kostanjevecki, V.; Grognet, P.; Vanmechelen, E.; et al. Phosphorylation of amyloid precursor carboxy-terminal fragments enhances their processing by a gamma-secretase-dependent mechanism. *Neurobiol. Dis.* **2005**, *20*, 625–637. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 131. Seifert, A.; Allan, L.A.; Clarke, P.R. DYRK1A phosphorylates caspase 9 at an inhibitory site and is potently inhibited in human cells by harmine. *FEBS J.* **2008**, *275*, 6268–6280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 132. Laguna, A.; Aranda, S.; Barallobre, M.J.; Barhoum, R.; Fernández, E.; Fotaki, V.; Delabar, J.M.; de la Luna, S.; de la Villa, P.; Arbonés, M.L. The protein kinase DYRK1A regulates caspase-9-mediated apoptosis during retina development. *Dev. Cell* **2008**, *15*, 841–853. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

133. Burré, J. The Synaptic Function of α -Synuclein. *J. Parkinson's Dis.* **2015**, *5*, 699–713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Guo, X.; Williams, J.G.; Schug, T.T.; Li, X. DYRK1A and DYRK3 promote cell survival through phosphorylation and activation of SIRT1. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 13223–13232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Sitz, J.H.; Baumgärtel, K.; Hämmerle, B.; Papadopoulos, C.; Hekerman, P.; Tejedor, F.J.; Becker, W.; Lutz, B. The Down syndrome candidate dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A phosphorylates the neurodegeneration-related septin 4. *Neuroscience* **2008**, *157*, 596–605. [[CrossRef](#)]
136. 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. Dyrk1A-mediated phosphorylation of Presenilin 1: A functional link between Down syndrome and Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **2010**, *115*, 574–584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Asai, M.; Kawakubo, T.; Mori, R.; Iwata, N. Elucidating Pathogenic Mechanisms of Early-onset Alzheimer's Disease in Down Syndrome Patients. *Yakugaku Zasshi* **2017**, *137*, 801–805. [[CrossRef](#)]
138. Kawakubo, T.; Mori, R.; Shirotani, K.; Iwata, N.; Asai, M. Nephylisin Is Suppressed by Dual-Specificity Tyrosine-Phosphorylation Regulated Kinase 1A (DYRK1A) in Down-Syndrome-Derived Fibroblasts. *Biol. Pharm. Bull.* **2017**, *40*, 327–333. [[CrossRef](#)]
139. Alldred, M.J.; Chao, H.M.; Lee, S.H.; Beilin, J.; Powers, B.E.; Petkova, E.; Strupp, B.J.; Ginsberg, S.D. CA1 pyramidal neuron gene expression mosaics in the Ts65Dn murine model of Down syndrome and Alzheimer's disease following maternal choline supplementation. *Hippocampus* **2018**, *28*, 251–268. [[CrossRef](#)]
140. Im, E.; Chung, K.C. Dyrk1A phosphorylates parkin at Ser-131 and negatively regulates its ubiquitin E3 ligase activity. *J. Neurochem.* **2015**, *134*, 756–768. [[CrossRef](#)]
141. Kang, J.E.; Choi, S.A.; Park, J.B.; Chung, K.C. Regulation of the proapoptotic activity of huntingtin interacting protein 1 by Dyrk1 and caspase-3 in hippocampal neuroprogenitor cells. *J. Neurosci. Res.* **2005**, *81*, 62–72. [[CrossRef](#)]
142. Xiang, J.; Yang, S.; Xin, N.; Gaertig, M.A.; Reeves, R.H.; Li, S.; Li, X.J. DYRK1A regulates Hap1-Dcaf7/WDR68 binding with implication for delayed growth in Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E1224–E1233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Willsey, H.R.; Xu, Y.; Everitt, A.; Dea, J.; Exner, C.R.T.; Willsey, A.J.; State, M.W.; Harland, R.M. The neurodevelopmental disorder risk gene DYRK1A is required for ciliogenesis and control of brain size in *Xenopus* embryos. *Development* **2020**, *147*. [[CrossRef](#)]
144. Suetsugu, M.; Mehraein, P. Spine distribution along the apical dendrites of the pyramidal neurons in Down's syndrome. A quantitative Golgi study. *Acta Neuropathol.* **1980**, *50*, 207–210. [[CrossRef](#)]
145. Ferrer, I.; Gullotta, F. Down's syndrome and Alzheimer's disease: Dendritic spine counts in the hippocampus. *Acta Neuropathol.* **1990**, *79*, 680–685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Haas, M.A.; Bell, D.; Slender, A.; Lana-Elola, E.; Watson-Scales, S.; Fisher, E.M.; Tybulewicz, V.L.; Guillemot, F. Alterations to dendritic spine morphology, but not dendrite patterning, of cortical projection neurons in Tc1 and Ts1Rhr mouse models of Down syndrome. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e78561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Martínez de Lagran, M.; Benavides-Piccione, R.; Ballesteros-Yañez, I.; Calvo, M.; Morales, M.; Fillat, C.; Defelipe, J.; Ramakers, G.J.; Dierssen, M. Dyrk1A influences neuronal morphogenesis through regulation of cytoskeletal dynamics in mammalian cortical neurons. *Cereb. Cortex* **2012**, *22*, 2867–2877. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Benavides-Piccione, R.; Dierssen, M.; Ballesteros-Yañez, I.; Martínez de Lagran, M.; Arbones, M.L.; Fotaki, V.; DeFelipe, J.; Elston, G.N. Alterations in the phenotype of neocortical pyramidal cells in the Dyrk1A^{+/−} mouse. *Neurobiol. Dis.* **2005**, *20*, 115–122. [[CrossRef](#)]
149. Dang, T.; Duan, W.Y.; Yu, B.; Tong, D.L.; Cheng, C.; Zhang, Y.F.; Wu, W.; Ye, K.; Zhang, W.X.; Wu, M.; et al. Autism-associated Dyrk1a truncation mutants impair neuronal dendritic and spine growth and interfere with postnatal cortical development. *Mol. Psychiatry* **2018**, *23*, 747–758. [[CrossRef](#)]
150. Liu, T.; Sims, D.; Baum, B. Parallel RNAi screens across different cell lines identify generic and cell type-specific regulators of actin organization and cell morphology. *Genome Biol.* **2009**, *10*, R26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
151. Kleschevnikov, A.M.; Belichenko, P.V.; Villar, A.J.; Epstein, C.J.; Malenka, R.C.; Mobley, W.C. Hippocampal long-term potentiation suppressed by increased inhibition in the Ts65Dn mouse, a genetic model of Down syndrome. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 8153–8160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Siarey, R.J.; Carlson, E.J.; Epstein, C.J.; Balbo, A.; Rapoport, S.I.; Galdzicki, Z. Increased synaptic depression in the Ts65Dn mouse, a model for mental retardation in Down syndrome. *Neuropharmacology* **1999**, *38*, 1917–1920. [[CrossRef](#)]
153. Siarey, R.J.; Kline-Burgess, A.; Cho, M.; Balbo, A.; Best, T.K.; Harashima, C.; Klann, E.; Galdzicki, Z. Altered signaling pathways underlying abnormal hippocampal synaptic plasticity in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *J. Neurochem.* **2006**, *98*, 1266–1277. [[CrossRef](#)]
154. Martínez-Cué, C.; Martínez, P.; Rueda, N.; Vidal, R.; García, S.; Vidal, V.; Corrales, A.; Montero, J.A.; Pazos, A.; Flórez, J.; et al. Reducing GABAA α 5 Receptor-Mediated Inhibition Rescues Functional and Neuromorphological Deficits in a Mouse Model of Down Syndrome. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 3953–3966. [[CrossRef](#)]
155. Begenisic, T.; Sansevero, G.; Baroncelli, L.; Cioni, G.; Sale, A. Early environmental therapy rescues brain development in a mouse model of Down syndrome. *Neurobiol. Dis.* **2015**, *82*, 409–419. [[CrossRef](#)]
156. Andrade-Talavera, Y.; Benito, I.; Casañas, J.J.; Rodríguez-Moreno, A.; Montesinos, M.L. Rapamycin restores BDNF-LTP and the persistence of long-term memory in a model of Down's syndrome. *Neurobiol. Dis.* **2015**, *82*, 516–525.

- [CrossRef]
157. Thomazeau, A.; Lassalle, O.; Iafrati, J.; Souchet, B.; Guedj, F.; Janel, N.; Chavis, P.; Delabar, J.; Manzoni, O.J. Prefrontal deficits in a murine model overexpressing the down syndrome candidate gene *dyrk1a*. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 1138–1147. [CrossRef]
 158. Braudeau, J.; Dauphinot, L.; Duchon, A.; Loistron, A.; Dodd, R.H.; Héroult, Y.; Delatour, B.; Potier, M.C. Chronic Treatment with a Promnesiant GABA-A $\alpha 5$ -Selective Inverse Agonist Increases Immediate Early Genes Expression during Memory Processing in Mice and Rectifies Their Expression Levels in a Down Syndrome Mouse Model. *Adv. Pharmacol. Sci.* **2011**, *2011*, 153218. [CrossRef]
 159. Duchon, A.; Del Mar Muñiz Moreno, M.; Lorenzo, S.M.; de Souza, M.P.S.; Chevalier, C.; Nalesso, V.; Meziane, H.; de Sousa, P.L.; Noblet, V.; Armspach, J.P.; et al. Multi-influential genetic interactions alter behaviour and cognition through six main biological cascades in Down syndrome mouse models. *Hum. Mol. Genet.* **2021**, *30*, 771–788. [CrossRef]
 160. Chen, H.; Firestein, B.L. RhoA regulates dendrite branching in hippocampal neurons by decreasing cypin protein levels. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 8378–8386. [CrossRef]
 161. Schwartz, N.; Schohl, A.; Ruthazer, E.S. Neural activity regulates synaptic properties and dendritic structure in vivo through calcineurin/NFAT signaling. *Neuron* **2009**, *62*, 655–669. [CrossRef] [PubMed]
 162. Freeman, A.; Franciscovich, A.; Bowers, M.; Sandstrom, D.J.; Sanyal, S. NFAT regulates pre-synaptic development and activity-dependent plasticity in *Drosophila*. *Mol. Cell Neurosci.* **2011**, *46*, 535–547. [CrossRef] [PubMed]
 163. Lisman, J.; Cooper, K.; Sehgal, M.; Silva, A.J. Memory formation depends on both synapse-specific modifications of synaptic strength and cell-specific increases in excitability. *Nat. Neurosci.* **2018**, *21*, 309–314. [CrossRef]
 164. Geng, J.; Wang, L.; Lee, J.Y.; Chen, C.K.; Chang, K.T. Phosphorylation of Synaptojanin Differentially Regulates Endocytosis of Functionally Distinct Synaptic Vesicle Pools. *J. Neurosci.* **2016**, *36*, 8882–8894. [CrossRef] [PubMed]
 165. Kim, Y.; Park, J.; Song, W.J.; Chang, S. Overexpression of *Dyrk1A* Causes the Defects in Synaptic Vesicle Endocytosis. *Neurosignals.* **2010**, *18*, 164–172. [CrossRef]
 166. Arque, G.; Casanovas, A.; Dierssen, M. *Dyrk1A* is dynamically expressed on subsets of motor neurons and in the neuromuscular junction: Possible role in Down syndrome. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e54285. [CrossRef]
 167. Wiseman, F.K.; Al-Janabi, T.; Hardy, J.; Karmiloff-Smith, A.; Nizetic, D.; Tybulewicz, V.L.; Fisher, E.M.; Strydom, A. A genetic cause of Alzheimer disease: Mechanistic insights from Down syndrome. *Nat. Rev. Neurosci.* **2015**, *16*, 564–574. [CrossRef]
 168. Contestabile, A.; Ciani, E.; Contestabile, A. The place of choline acetyltransferase activity measurement in the “Cholinergic hypothesis” of neurodegenerative diseases. *Neurochem. Res.* **2008**, *33*, 318–327. [CrossRef]
 169. Granholm, A.C.; Sanders, L.A.; Crnic, L.S. Loss of cholinergic phenotype in basal forebrain coincides with cognitive decline in a mouse model of Down’s syndrome. *Exp. Neurol.* **2000**, *161*, 647–663. [CrossRef]
 170. Hunter, C.L.; Isacson, O.; Nelson, M.; Bimonte-Nelson, H.; Seo, H.; Lin, L.; Ford, K.; Kindy, M.S.; Granholm, A.C. Regional alterations in amyloid precursor protein and nerve growth factor across age in a mouse model of Down’s syndrome. *Neurosci Res* **2003**, *45*, 437–445. [CrossRef]
 171. Seo, H.; Isacson, O. Abnormal APP, cholinergic and cognitive function in Ts65Dn Down’s model mice. *Exp. Neurol.* **2005**, *193*, 469–480. [CrossRef] [PubMed]
 172. Lockrow, J.; Boger, H.; Gerhardt, G.; Aston-Jones, G.; Bachman, D.; Granholm, A.C. A noradrenergic lesion exacerbates neurodegeneration in a Down syndrome mouse model. *J. Alzheimer’s Dis.* **2011**, *23*, 471–489. [CrossRef] [PubMed]
 173. Lockrow, J.P.; Fortress, A.M.; Granholm, A.C. Age-related neurodegeneration and memory loss in down syndrome. *Curr. Gerontol. Geriatr. Res.* **2012**, *2012*, 463909. [CrossRef]
 174. Illouz, T.; Madar, R.; Biragyn, A.; Okun, E. Restoring microglial and astroglial homeostasis using DNA immunization in a Down Syndrome mouse model. *Brain Behav. Immun.* **2019**, *75*, 163–180. [CrossRef]
 175. Kelley, C.M.; Powers, B.E.; Velazquez, R.; Ash, J.A.; Ginsberg, S.D.; Strupp, B.J.; Mufson, E.J. Sex differences in the cholinergic basal forebrain in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome and Alzheimer’s disease. *Brain Pathol.* **2014**, *24*, 33–44. [CrossRef]
 176. Dierssen, M.; Vallina, I.F.; Baamonde, C.; Garcia-Calatayud, S.; Lumberras, M.A.; Florez, J. Alterations of central noradrenergic transmission in Ts65Dn mouse, a model for Down syndrome. *Brain Res.* **1997**, *749*, 238–244. [CrossRef]
 177. Hunter, C.L.; Bimonte-Nelson, H.A.; Nelson, M.; Eckman, C.B.; Granholm, A.C. Behavioral and neurobiological markers of Alzheimer’s disease in Ts65Dn mice: Effects of estrogen. *Neurobiol. Aging* **2004**, *25*, 873–884. [CrossRef]
 178. Lomoio, S.; Scherini, E.; Necchi, D. Beta-amyloid overload does not directly correlate with SAPK/JNK activation and tau protein phosphorylation in the cerebellar cortex of Ts65Dn mice. *Brain Res.* **2009**, *1297*, 198–206. [CrossRef]
 179. Sansevero, G.; Begenisic, T.; Mainardi, M.; Sale, A. Experience-dependent reduction of soluble β -amyloid oligomers and rescue of cognitive abilities in middle-age Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *Exp. Neurol.* **2016**, *283*, 49–56. [CrossRef]
 180. Pop, C.; Timmer, J.; Sperandio, S.; Salvesen, G.S. The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Mol. Cell* **2006**, *22*, 269–275. [CrossRef] [PubMed]
 181. Allan, L.A.; Morrice, N.; Brady, S.; Magee, G.; Pathak, S.; Clarke, P.R. Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nat. Cell Biol.* **2003**, *5*, 647–654. [CrossRef]
 182. Brady, S.C.; Allan, L.A.; Clarke, P.R. Regulation of caspase 9 through phosphorylation by protein kinase C zeta in response to hyperosmotic stress. *Mol. Cell Biol.* **2005**, *25*, 10543–10555. [CrossRef] [PubMed]

183. Martin, M.C.; Allan, L.A.; Lickrish, M.; Sampson, C.; Morrice, N.; Clarke, P.R. Protein kinase A regulates caspase-9 activation by Apaf-1 downstream of cytochrome c. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 15449–15455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Budihardjo, I.; Oliver, H.; Lutter, M.; Luo, X.; Wang, X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1999**, *15*, 269–290. [[CrossRef](#)]
185. Ferrer, I.; Barrachina, M.; Puig, B.; Martínez de Lagrán, M.; Martí, E.; Avila, J.; Dierssen, M. Constitutive Dyrk1A is abnormally expressed in Alzheimer disease, Down syndrome, Pick disease, and related transgenic models. *Neurobiol. Dis.* **2005**, *20*, 392–400. [[CrossRef](#)]
186. Kimura, R.; Kamino, K.; Yamamoto, M.; Nuripa, A.; Kida, T.; Kazui, H.; Hashimoto, R.; Tanaka, T.; Kudo, T.; Yamagata, H.; et al. The DYRK1A gene, encoded in chromosome 21 Down syndrome critical region, bridges between beta-amyloid production and tau phosphorylation in Alzheimer disease. *Hum. Mol. Genet.* **2007**, *16*, 15–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Wegiel, J.; Kaczmarek, W.; Barua, M.; Kuchna, I.; Nowicki, K.; Wang, K.C.; Yang, S.M.; Frackowiak, J.; Mazur-Kolecka, B.; Silverman, W.P.; et al. Link between DYRK1A overexpression and several-fold enhancement of neurofibrillary degeneration with 3-repeat tau protein in Down syndrome. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2011**, *70*, 36–50. [[CrossRef](#)]
188. Wegiel, J.; Gong, C.X.; Hwang, Y.W. The role of DYRK1A in neurodegenerative diseases. *FEBS J.* **2011**, *278*, 236–245. [[CrossRef](#)]
189. Park, J.; Chung, K.C. New Perspectives of Dyrk1A Role in Neurogenesis and Neuropathologic Features of Down Syndrome. *Exp. Neurobiol.* **2013**, *22*, 244–248. [[CrossRef](#)]
190. Latour, A.; Gu, Y.; Kassis, N.; Daubigny, F.; Colin, C.; Gausserès, B.; Middendorp, S.; Paul, J.L.; Hindié, V.; Rain, J.C.; et al. LPS-Induced Inflammation Abolishes the Effect of DYRK1A on IκB Stability in the Brain of Mice. *Mol. Neurobiol.* **2019**, *56*, 963–975. [[CrossRef](#)]
191. Herault, Y.; Delabar, J.M.; Fisher, E.M.C.; Tybulewicz, V.L.J.; Yu, E.; Brault, V. Rodent models in Down syndrome research: Impact and future opportunities. *Dis. Models Mech.* **2017**, *10*, 1165–1186. [[CrossRef](#)]
192. Duchon, A.; Herault, Y. DYRK1A, a Dosage-Sensitive Gene Involved in Neurodevelopmental Disorders, Is a Target for Drug Development in Down Syndrome. *Front. Behav. Neurosci.* **2016**, *10*, 104. [[CrossRef](#)]
193. Ortiz-Abalia, J.; Sahún, I.; Altafaj, X.; Andreu, N.; Estivill, X.; Dierssen, M.; Fillat, C. Targeting Dyrk1A with AAVshRNA attenuates motor alterations in TgDyrk1A, a mouse model of Down syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **2008**, *83*, 479–488. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
194. García-Cerro, S.; Rueda, N.; Vidal, V.; Lantigua, S.; Martínez-Cué, C. Normalizing the gene dosage of Dyrk1A in a mouse model of Down syndrome rescues several Alzheimer’s disease phenotypes. *Neurobiol. Dis.* **2017**, *106*, 76–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
195. Altafaj, X.; Martín, E.D.; Ortiz-Abalia, J.; Valderrama, A.; Lao-Peregrín, C.; Dierssen, M.; Fillat, C. Normalization of Dyrk1A expression by AAV2/1-shDyrk1A attenuates hippocampal-dependent defects in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Neurobiol. Dis.* **2013**, *52*, 117–127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
196. De la Torre, R.; De Sola, S.; Pons, M.; Duchon, A.; Martínez de Lagran, M.; Farre, M.; Fito, M.; Benejam, B.; Langohr, K.; Rodriguez, J.; et al. Epigallocatechin-3-gallate, a DYRK1A inhibitor, rescues cognitive deficits in Down syndrome mouse models and in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* **2014**, *58*, 278–288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
197. Guedj, F.; Sébrié, C.; Rivals, I.; Ledru, A.; Paly, E.; Bizot, J.C.; Smith, D.; Rubin, E.; Gillet, B.; Arbones, M.; et al. Green tea polyphenols rescue of brain defects induced by overexpression of DYRK1A. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e4606. [[CrossRef](#)]
198. Noll, C.; Tlili, A.; Ripoll, C.; Mallet, L.; Paul, J.L.; Delabar, J.M.; Janel, N. Dyrk1a activates antioxidant NQO1 expression through an ERK1/2-Nrf2 dependent mechanism. *Mol. Genet. Metab.* **2012**, *105*, 484–488. [[CrossRef](#)]
199. de la Torre, R.; de Sola, S.; Hernandez, G.; Farre, M.; Pujol, J.; Rodriguez, J.; Espadaler, J.M.; Langohr, K.; Cuenca-Royo, A.; Principe, A.; et al. 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.* **2016**, *15*, 801–810. [[CrossRef](#)]
200. 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. A chemical with proven clinical safety rescues Down-syndrome-related phenotypes in through DYRK1A inhibition. *Dis. Models Mech.* **2016**, *9*, 839–848. [[CrossRef](#)]
201. Neumann, F.; Gourdain, S.; Albac, C.; Dekker, A.D.; Bui, L.C.; Dairou, J.; Schmitz-Afonso, I.; Hue, N.; Rodrigues-Lima, F.; Delabar, J.M.; et al. DYRK1A inhibition and cognitive rescue in a Down syndrome mouse model are induced by new fluoro-DANDY derivatives. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 2859. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
202. Bain, J.; Plater, L.; Elliott, M.; Shpiro, N.; Hastie, C.J.; McLauchlan, H.; Klevernic, I.; Arthur, J.S.; Alessi, D.R.; Cohen, P. The selectivity of protein kinase inhibitors: A further update. *Biochem. J.* **2007**, *408*, 297–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
203. Guedj, F.; Pereira, P.L.; Najas, S.; Barallobre, M.J.; Chabert, C.; Souchet, B.; Sebrie, C.; Verney, C.; Herault, Y.; Arbones, M.; et al. DYRK1A: A master regulatory protein controlling brain growth. *Neurobiol. Dis.* **2012**, *46*, 190–203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
204. Reeves, R.H.; Irving, N.G.; Moran, T.H.; Wohn, A.; Kitt, C.; Sisodia, S.S.; Schmidt, C.; Bronson, R.T.; Davisson, M.T. A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat. Genet.* **1995**, *11*, 177–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
205. Duchon, A.; Raveau, M.; Chevalier, C.; Nalesso, V.; Sharp, A.J.; Herault, Y. Identification of the translocation breakpoints in the Ts65Dn and Ts1Cje mouse lines: Relevance for modeling Down syndrome. *Mamm. Genome* **2011**, *22*, 674–684. [[CrossRef](#)]

206. Mazur-Kolecka, B.; Golabek, A.; Kida, E.; Rabe, A.; Hwang, Y.W.; Adayev, T.; Wegiel, J.; Flory, M.; Kaczmarek, W.; Marchi, E.; et al. Effect of DYRK1A activity inhibition on development of neuronal progenitors isolated from Ts65Dn mice. *J. Neurosci. Res.* **2012**, *90*, 999–1010. [[CrossRef](#)]
207. Frost, D.; Meechoovet, B.; Wang, T.; Gately, S.; Giorgetti, M.; Shcherbakova, I.; Dunckley, T. β -carboline compounds, including harmine, inhibit DYRK1A and tau phosphorylation at multiple Alzheimer's disease-related sites. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e19264. [[CrossRef](#)]
208. Kim, H.; Sablin, S.O.; Ramsay, R.R. Inhibition of monoamine oxidase A by beta-carboline derivatives. *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *337*, 137–142. [[CrossRef](#)]
209. Drung, B.; Scholz, C.; Barbosa, V.A.; Nazari, A.; Sarragiotto, M.H.; Schmidt, B. Computational & experimental evaluation of the structure/activity relationship of β -carbolines as DYRK1A inhibitors. *Bioorgan. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 4854–4860. [[CrossRef](#)]
210. Rügen, K.; Wurzlbauer, A.; Walte, A.; Sippl, W.; Bracher, F.; Becker, W. Selectivity Profiling and Biological Activity of Novel β -Carbolines as Potent and Selective DYRK1 Kinase Inhibitors. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0132453. [[CrossRef](#)]
211. Pranzatelli, M.R.; Snodgrass, S.R. Harmala alkaloids and related beta-carbolines: A myoclonic model and antimyoclonic drugs. *Exp. Neurol.* **1987**, *96*, 703–719. [[CrossRef](#)]
212. Chen, L.; Feany, M.B. Alpha-synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a Drosophila model of Parkinson disease. *Nat. Neurosci.* **2005**, *8*, 657–663. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
213. Bain, J.; McLaughlan, H.; Elliott, M.; Cohen, P. The specificities of protein kinase inhibitors: An update. *Biochem. J.* **2003**, *371*, 199–204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
214. Stringer, M.; Abeysekera, I.; Thomas, J.; LaCombe, J.; Stancombe, K.; Stewart, R.J.; Dria, K.J.; Wallace, J.M.; Goodlett, C.R.; Roper, R.J. 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.* **2017**, *177*, 230–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
215. Gu, Y.; Moroy, G.; Paul, J.-L.; Rebillat, A.-S.; Dierssen, M.; de la Torre, R.; Cieuta-Walti, C.; Dairou, J.; Janel, N. Molecular Rescue of Dyrk1A Overexpression Alterations in Mice with Fontup (R) Dietary Supplement: Role of Green Tea Catechins. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1404. [[CrossRef](#)]
216. Goodlett, C.R.; Stringer, M.; LaCombe, J.; Patel, R.; Wallace, J.M.; Roper, R.J. Evaluation of the therapeutic potential of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) via oral gavage in young adult Down syndrome mice. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 10426. [[CrossRef](#)]
217. Debdab, M.; Carreaux, F.; Renault, S.; Soundararajan, M.; Fedorov, O.; Filippakopoulos, P.; Lozach, O.; Babault, L.; Tahtouh, T.; Baratte, B.; et al. 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-mRNA splicing. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4172–4186. [[CrossRef](#)]
218. Li, Z.; Yu, T.; Morishima, M.; Pao, A.; Laduca, J.; Conroy, J.; Nowak, N.; Matsui, S.; Shiraishi, I.; Yu, Y.E. Duplication of the entire 22.9 Mb human chromosome 21 syntenic region on mouse chromosome 16 causes cardiovascular and gastrointestinal abnormalities. *Hum. Mol. Genet.* **2007**, *16*, 1359–1366. [[CrossRef](#)]
219. Naert, G.; Ferré, V.; Meunier, J.; Keller, E.; Malmström, S.; Givalois, L.; Carreaux, F.; Bazureau, J.P.; Maurice, T. 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.* **2015**, *25*, 2170–2182. [[CrossRef](#)]
220. Gourdain, S.; Dairou, J.; Denhez, C.; Bui, L.C.; Rodrigues-Lima, F.; Janel, N.; Delabar, J.M.; Cariou, K.; Dodd, R.H. Development of DANDYS, new 3,5-diaryl-7-azaindoles demonstrating potent DYRK1A kinase inhibitory activity. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9569–9585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
221. Masaki, S.; Kii, I.; Sumida, Y.; Kato-Sumida, T.; Ogawa, Y.; Ito, N.; Nakamura, M.; Sonamoto, R.; Kataoka, N.; Hosoya, T.; et al. Design and synthesis of a potent inhibitor of class 1 DYRK kinases as a suppressor of adipogenesis. *Bioorgan. Med. Chem.* **2015**, *23*, 4434–4441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
222. Sonamoto, R.; Kii, I.; Koike, Y.; Sumida, Y.; Kato-Sumida, T.; Okuno, Y.; Hosoya, T.; Hagiwara, M. Identification of a DYRK1A inhibitor that induces degradation of the target kinase using Co-chaperone CDC37 fused with Luciferase nanoKAZ. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 12728. [[CrossRef](#)]
223. Shen, W.; Tremblay, M.S.; Deshmukh, V.A.; Wang, W.; Filippi, C.M.; Harb, G.; Zhang, Y.Q.; Kamireddy, A.; Baaten, J.E.; Jin, Q.; et al. Small-molecule inducer of β cell proliferation identified by high-throughput screening. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1669–1672. [[CrossRef](#)]
224. Shen, W.; Taylor, B.; Jin, Q.; Nguyen-Tran, V.; Meeusen, S.; Zhang, Y.Q.; Kamireddy, A.; Swafford, A.; Powers, A.F.; Walker, J.; et al. Inhibition of DYRK1A and GSK3B induces human β -cell proliferation. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8372. [[CrossRef](#)]
225. Nakano-Kobayashi, A.; Awaya, T.; Kii, I.; Sumida, Y.; Okuno, Y.; Yoshida, S.; Sumida, T.; Inoue, H.; Hosoya, T.; Hagiwara, M. Prenatal neurogenesis induction therapy normalizes brain structure and function in Down syndrome mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 10268–10273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
226. Souchet, B.; Duchon, A.; Gu, Y.; Dairou, J.; Chevalier, C.; Daubigney, F.; Nalesso, V.; Creau, N.; Yu, Y.; Janel, N.; et al. Prenatal treatment with EGCG enriched green tea extract rescues GAD67 related developmental and cognitive defects in

- Down syndrome mouse models. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 3914. [[CrossRef](#)]
227. Zorrilla de San Martin, J.; Delabar, J.M.; Bacci, A.; Potier, M.C. GABAergic over-inhibition, a promising hypothesis for cognitive deficits in Down syndrome. *Free Radic. Biol. Med.* **2018**, *114*, 33–39. [[CrossRef](#)]
228. Contestabile, A.; Magara, S.; Cancedda, L. The GABAergic Hypothesis for Cognitive Disabilities in Down Syndrome. *Front. Cell Neurosci.* **2017**, *11*, 54. [[CrossRef](#)]
229. McElyea, S.D.; Starbuck, J.M.; Tumbleson-Brink, D.M.; Harrington, E.; Blazek, J.D.; Ghoneima, A.; Kula, K.; Roper, R.J. Influence of prenatal EGCG treatment and Dyrk1a dosage reduction on craniofacial features associated with Down syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **2016**, *25*, 4856–4869. [[CrossRef](#)]
230. Stagni, F.; Giacomini, A.; Emili, M.; Trazzi, S.; Guidi, S.; Sassi, M.; Ciani, E.; Rimondini, R.; Bartesaghi, R. Short- and long-term effects of neonatal pharmacotherapy with epigallocatechin-3-gallate on hippocampal development in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Neuroscience* **2016**, *333*, 277–301. [[CrossRef](#)]
231. Starbuck, J.M.; Llambrich, S.; González, R.; Albaigès, J.; Sarlé, A.; Wouters, J.; González, A.; Sevillano, X.; Sharpe, J.; De La Torre, R.; et al. Green tea extracts containing epigallocatechin-3-gallate modulate facial development in Down syndrome. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 4715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
232. Xicota, L.; Rodríguez, J.; Langohr, K.; Fitó, M.; Dierssen, M.; de la Torre, R.; TESDAD Study Group. Effect of epigallocatechin gallate on the body composition and lipid profile of down syndrome individuals: Implications for clinical management. *Clin. Nutr.* **2020**, *39*, 1292–1300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
233. Jiang, X.; Liu, C.; Yu, T.; Zhang, L.; Meng, K.; Xing, Z.; Belichenko, P.V.; Kleschevnikov, A.M.; Pao, A.; Peresie, J.; et al. Genetic dissection of the Down syndrome critical region. *Hum. Mol. Genet.* **2015**, *24*, 6540–6551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
234. Marechal, D.; Brault, V.; Leon, A.; Martin, D.; Pereira, P.L.; Loaëc, N.; Birling, M.C.; Friocourt, G.; Blondel, M.; Herault, Y. Cbs overdosage is necessary and sufficient to induce cognitive phenotypes in mouse models of Down syndrome and interacts genetically with Dyrk1a. *Hum. Mol. Genet.* **2019**, *28*, 1561–1577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Projets

Ce travail de recherche se divise en trois principaux objectifs, tous trois centrés sur DYRK1A.

Le **premier objectif** est la validation et la caractérisation d'un nouveau modèle rat trisomique pour le gène *Dyrk1a*. L'impact de la surexpression de la kinase DYRK1A sur les capacités cognitives a été largement étudié chez des modèles souris présentant une trisomie du gène *Dyrk1a*, notamment les modèles Dp1Yey et Tg(*Dyrk1a*). Un modèle rat présentant trois copies du gène *Dyrk1a* permettra de mieux comprendre les mécanismes neurologiques perturbés dans le SD chez cette espèce, de réaliser des tests pharmacologiques d'inhibiteurs de l'activité kinase de *Dyrk1a* ainsi que de comparer les résultats obtenus à ceux des modèles souris transgéniques pour le gène *Dyrk1a*. Le génome et la physiologie de la souris et du rat ont de grandes similitudes avec ceux de l'homme, de ce fait, l'obtention de résultats similaires sur les deux espèces seront plus solides pour la translation chez l'homme. Au cours des deux dernières décennies, les souris ont progressivement pris plus de place dans la science biomédicale par rapport aux rats. Ce changement provient de la disponibilité des technologies de manipulation génétique plus important pour les souris. L'émergence des technologies d'édition du génome avec le système CRISP/Cas9 permet de modifier le génome du rat aussi aisément que celui de la souris (Jinek et al. 2014; Ellenbroek et Youn 2016). Il faut également noter qu'un modèle rat permet de mieux explorer le comportement, la cognition, la mémoire et les interactions sociales par rapport au modèle souris. De plus, du fait de leur meilleure capacité sociable, les rats sont des excellents modèles pour étudier les troubles du spectre de l'autisme tels que ceux observés dans le MRD7 (Ellenbroek et Youn 2016). Le rat est donc un modèle solide pour étudier les syndromes de déficience intellectuelle. Ce projet est présenté sous forme d'une publication scientifique comprenant la validation et la caractérisation phénotypique du modèle rat trisomique pour le gène *Dyrk1a*, noté Dup₂(*Dyrk1a*). Ce travail introduira aussi le modèle rat Del(*Dyrk1a*) présentant une délétion du gène *Dyrk1a*, un modèle du syndrome MRD7, dont la caractérisation phénotypique a été réalisée par le Dr. Damien Maréchal.

Le **second objectif** de ce travail de thèse a été la validation de nouveaux inhibiteurs de la kinase DYRK1A, optimisés pour améliorer les capacités cognitives du SD sur des modèles rongeurs. Les études préalables réalisées par le Dr. Thu-Lan Nguyen en collaboration avec le Dr. Laurent Meijer de chez Manros Therapeutics (Roscoff, France) ont mis en évidence une normalisation de l'activité kinase de DYRK1A associée à un rétablissement des fonctions mnésiques des souris modèles du SD suite au traitement à la Leucettine 41 (L41) (Nguyen et al. 2018). Dans ce projet, nous avons évalué l'action des Leucettinibs, un nouvel ensemble d'inhibiteurs de DYRK1A dérivés de la L41, pour améliorer la cognition des modèles de souris et de rat du SD. Le but de ce projet est de participer à la validation d'un candidat médicament pour l'amélioration des compétences intellectuelles des porteurs de la T21 afin de leur permettre d'acquérir une meilleure qualité de vie.

Le **troisième objectif** a été l'identification de potentiels nouveaux interacteurs de DYRK1A. Comme expliqué dans l'introduction, DYRK1A est impliquée dans de nombreux processus physiologiques à travers sa fonction kinase ainsi que d'interaction protéine-protéine. Réussir à identifier de nouveaux partenaires protéiques de DYRK1A et potentiellement de nouvelles cibles de son activité catalytique permettrait de mettre en lumière les mécanismes biologiques sous-jacents aux déficits cognitifs observés dans les modèles du SD.

Matériels & Méthodes

Projet I : Validation et modélisation d'un nouveau modèle rat surexprimant le gène DYRK1A

La partie Matériel et Méthode de ce projet est décrite dans l'article intitulé « New rat models with duplication and deletion of *Dyrk1a* for assessment of Down and MRD7 syndromes », page 149.

Projet II : Validation d'inhibiteurs de la kinase DYRK1A optimisés pour améliorer les capacités cognitives sur des modèles rongeurs du syndrome de Down

I. Animaux

1. Modèles animaux

Les animaux utilisés au cours de ce projet ont été générés au sein de notre établissement utilisateur, l'Institut Clinique de la Souris (ICS), Illkirch, France.

Les modèles souris utilisés dans ce projet sont le modèle transgénique Tg(*Dyrk1a*), présentant une duplication du gène murin *Dyrk1a* et le modèle Dp1Yey, trisomique pour la région du Mmu16 synténique au Hsa21, région de 22.9 Mb (Souchet et al. 2014; Li et al. 2007). Les deux lignées sont maintenues sur le fond génétique C57BL/6J.

Les modèles de rats du SD utilisés dans ce projet ont été créés avec la technologie « *CRISpr MEdiated REarrangement* » (CRISMERE), qui tire parti du système CRISPR/Cas9, pour générer les réarrangements souhaités (Birling et al. 2017). Les modèles utilisés sont les rats Dup(Rno11)-APP^{H3} et Dup(Rno11-20)-APP^{H3}. Le modèle Dup(Rno11)-APP^{H3} présente une duplication de la région du chromosome Hsa21 synténique au chromosome Rno11 où est localisé le gène *Dyrk1a*. Les rats Dup(Rno11)-APP^{H3} correspondent au modèle de T21 partielle. Le second modèle Dup(Rno11-20)-APP^{H3} exprime une T21 complète avec une duplication des régions synténiques au Hsa21 situées sur le Rno11 et le Rno20. Les deux modèles rats utilisés dans ce projet présentent une humanisation du gène de l'APP sur le chromosome Rno11 et est donc exprimé en trois copies, notées APP^{H3}. Pour générer les cohortes de ce projet, les modèles rats Dup(Rno11)-APP^{H3} et Dup(Rno20)-APP^{H2} ont été croisés entre eux. Le croisement de ces deux modèles permet d'obtenir différents génotypes : les rats Dup(Rno11)-APP^{H3} (trisomie partielle), les Dup(Rno11-20)-APP^{H3} (trisomie complète) et les rats APP^{H2} (disomiques, possédant deux copies du gène *App* humanisé). Le modèle Dup(Rno20)-APP^{H2} est également obtenu grâce à ce croisement. Mais ce modèle ne présentant pas de trisomie du gène *Dyrk1a*,

ne sera donc pas étudié au cours de ce projet. La **Figure 16** schématise les différents modèles souris et rats utilisés au cours de ce projet.

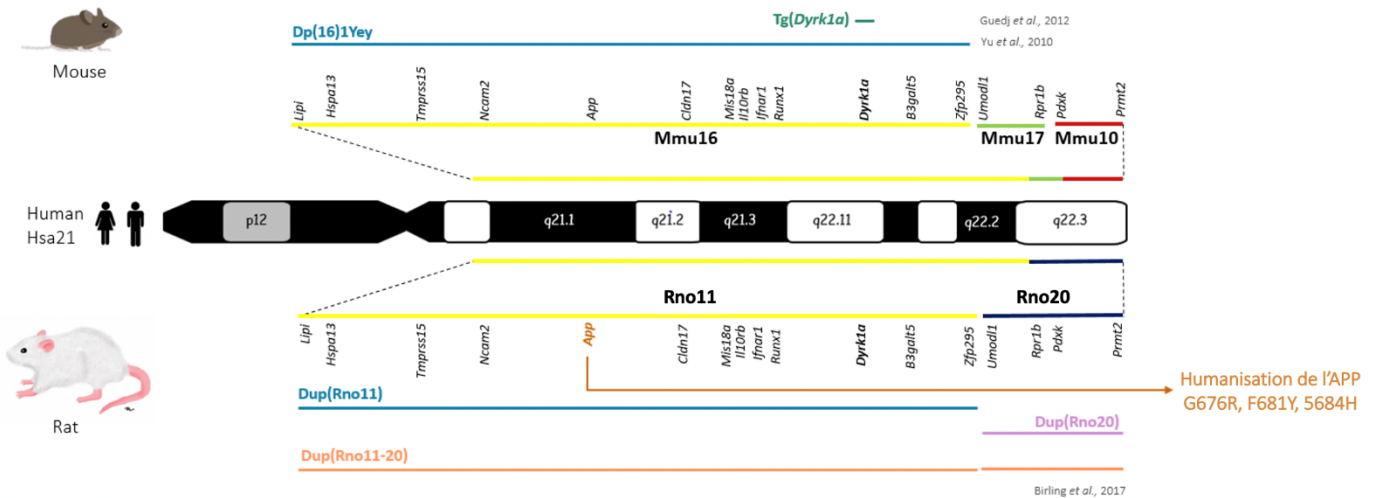


Figure 16 : Représentation des différents modèles souris et rats du SD utilisés dans ce projet.

Au centre de la figure se trouve le Hsa21. La partie supérieure représente les régions chromosomiques Mmu16, Mmu17 et Mmu10 synténiques au Hsa21. La partie inférieure correspond aux régions chromosomiques du rat, Rno11 et Rno20, synténiques au Hsa21. Les intervalles dupliqués chez les modèles souris Tg(*Dyrk1a*) et Dp1Yey et chez les modèles rat Dup(Rno11)-APP^{H3}, Dup(Rno20)-APP^{H2} et Dup(Rno11-20)-APP^{H3} sont également schématisés. L’humanisation du gène de l’App est aussi représentée : G676R, F681Y et 5684H.

2. Condition d’hébergement

Les animaux sont transférés dans la zone de phénotypage 2 à 3 semaines avant le début des tests de phénotypages. Dans la zone de phénotypage, les souris sont hébergées dans des cages étanches et individuellement ventilées (Sealsafe® Plus #GM500, Tecniplast, France). Aucun animal n’est isolé, les animaux sont hébergés au maximum par groupe de 5 pour les femelles et par groupe de 4 pour les mâles. Dans la zone de phénotypage, les rats sont eux dans des cages jetables en plastique (Innocage® #R-BTM-H, Innovive, Paris, France) placées sur des portoirs ventilés. Les rats sont hébergés par deux et disposent d’un bâton en bois à ronger en guise d’enrichissement. Les souris et rats ont un accès *ad libitum* à l’eau et à la nourriture. Les pièces de stabulation sont soumises à un cycle lumière/obscurité de 12 heures (h) où l’éclairage

en lumière artificielle débute à 7h du matin. La température des salles d'hébergements est contrôlée ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$).

3. Autorisation de projet

Toutes les expériences réalisées sur les animaux au cours de ce projet respectent les directives nationales (décret n°2013-118 du 1^{er} février 2013) du Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale, ainsi que les directives européennes (directives 2010/63/UE) relatives à la protection des animaux utilisés dans la recherche. Ces projets ont été réalisés sous l'agrément du comité d'éthique interne (n°17). Le Dr. Yann Hérault, directeur de l'ICS, possède l'accréditation pour les expérimentations de ce projet sous les numéros APAFIS #22640 et #27134 concernant les études d'inhibiteurs de DYRK1A sur les souris, et sous le numéro #27134 pour l'étude sur les rats. Par ailleurs, les modèles rats comprenant une duplication de la région du chromosome Rno11 sont à phénotypes dommageables. En effet, les premières études réalisées chez ces animaux ont mis en évidence une sensibilité aux staphylocoques dorés pouvant entraîner le développement de lésions cutanées. De ce fait, le maintien et la production des cohortes de ces modèles sont sous le numéro d'accréditation APAFIS #31362. Concernant les études d'IRMf réalisées au Laboratoire des sciences de l'ingénieur, de l'informatique et de l'imagerie (iCUBE) par l'équipe du Dr. Laura Harsan, le numéro d'autorisation APAFIS est #20210.

II. Génotypage

1. Génotypage des modèles souris

Les modèles souris sont génotypés par Réaction de Polymérase en Chaîne (PCR).

1.1 Digestion tissulaire pour l'extraction d'ADN

Dans les dix jours suivant la naissance des animaux, une biopsie de la queue des souris ou du pavillon de l'oreille des rats sont prélevés pour le génotypage des animaux. La digestion tissulaire des biopsies a été réalisée selon deux méthodes en fonction des lignées utilisées. Ces méthodes sont expliquées ci-dessous.

1.1.1. Digestion tissulaire avec l'hydroxyde de sodium (NaOH)

La technique de digestion tissulaire avec le NaOH a été utilisée sur la lignée de souris Tg(*Dyrk1a*). Les biopsies de souris sont digérées dans 200 µL de solution de NaOH à 50 mM et incubées pendant 30 minutes (min) à 95°C. Une fois le tissu digéré, 25 µL de Tris-HCl pH=8 sont ajoutés aux échantillons. Ces derniers sont ensuite centrifugés à 14000 rotations par minutes (rpm) pendant 10 min et le surnageant est utilisé pour la réaction de PCR.

1.1.2. Digestion tissulaire par Direct PCR

La technique de Direct PCR a permis la digestion tissulaire dans le cadre du génotypage de la lignée de souris Dp1Yey. Les biopsies de souris sont digérées dans 100 µL de tampon de lyse (DirectPCR Reagent, Viagen #102-T) auxquels 10 µL de Protéinase K 10 µg/µL (#P6556-1G, Sigma-Aldrich) sont ajoutés. Les échantillons sont ensuite incubés dans un bain-marie à 56°C toute une nuit. Une fois la digestion terminée, les échantillons sont agités puis incubés à 95°C pendant 30 min afin d'inactiver les protéases. Pour finir, les échantillons sont centrifugés pendant 5 min à 13000 rpm et le surnageant est utilisé pour la réaction de PCR.

1.2 Amplification de l'ADN

1.2.1. Amplification par la technique de PCR pour la lignée de souris Tg(*Dyrk1a*)

Pour la réaction de PCR, 1 µL d'ADN dilué au 1/10^{ème} est supplémenté à 14 µL d'un mix dont la composition est détaillée dans la **Table 2**. Les amorces utilisées pour l'amplification de l'ADN et permettant d'une part d'identifier l'allèle transgénique (surexprimant DYRK1A) et d'autre part le gène de référence *Fez* (présent en 2 copies) sont les suivantes : Dyrk1-L (5'- TGG GCC AAG CAG TTA GGA GTT T -3') et Bac-11 (5'- CCA TGA TTA CGC CAA GCT ATT TAG G -3') pour l'allèle transgénique et Fez-L (5'- GCT TCG GGA GCA GGT ACC CTA T -3') et Fez-R (5'- CAA GAT CTG AGG CTC GCC AAG T -3'). Les réactions de PCR sont réalisées dans un thermocycleur selon les conditions de dénaturation, d'hybridation et d'élongation décrites dans la **Table 3**.

	Concentration finale	Volume final
Tampon de réaction + MgCl ₂	1x	1,5µL
dNTP	10µM	0,3µL
Amorces de l'allèle transgénique	10µM	0,5µL
Amorces du gène de référence	10µM	0,3 µL
Taq polymérase (Roche)	5U/µL	0,2µL
ADN	~ 100ng	1,5µL
H ₂ O	/	10,4 µL

Table 2 : Composition du mix pour l'amplification d'ADN lors de la PCR de la lignée Tg(*Dyrk1a*).

La composition décrite correspond à la préparation du mix pour un seul échantillon.

Température	Temps	Nombre de cycles
94°C	5 min	1
94°C	30 s	35
60°C	30 s	
68°C	1 min	
68°C	10 min	1

Table 3 : Conditions de la PCR pour la lignée souris Tg(*Dyrk1a*).

1.2.2. Amplification par la technique de PCR pour la lignée souris Dp1Yey

Comme pour la réaction de PCR précédente, 1 µL d'ADN dilué au 1/10^{ème} est supplémenté à 14µL d'un mix dont la composition est détaillée dans la **Table 4**. Les amorces utilisées pour l'amplification de l'ADN et permettant de différencier l'allèle dupliqué et le gène CI de référence hors du Mmu16 de la lignée Dp1Yey sont les suivantes : Yey-F (5'- TAT TAG GAC AAG GCT GGT GG -3') et Yey-R (5'- GTC AGT GGT TGT GAC TTG TG -3') pour identifier l'allèle

dupliquée ; et CI-F (5'- CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT -3') et CI-R (5'- GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C -3'). Les réactions de PCR sont réalisées dans un thermocycleur selon les conditions décrites dans la **Table 5**.

	Concentration finale	Volume final
Tampon de réaction + MgCl ₂	1x	1,5μL
dNTP	2mM	0,3μL
Amorces pour l'allèle dupliqué	10μM	0,25μL
Amorces du gène de référence	10μM	0,25μL
Taq polymérase (Roche)	1U/μL	0,2μL
ADN	~ 100ng	1,5μL
H ₂ O	/	10,5 μL

Table 4 : Composition du mix pour l'amplification d'ADN lors de la PCR de la lignée Dp1Yey.

La composition décrite correspond à la préparation du mix pour un seul échantillon.

Température	Temps	Nombre de cycles
95°C	2 min	1
95°C	20 s	35
60°C	20 s	
72°C	30 s	
72°C	7 min	1

Table 5 : Conditions de la PCR de la lignée souris Dp1Yey

1.3 Migration par électrophorèse sur gel d'agarose

Les produits de PCR obtenus sont séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur un gel d'agarose de 2% contenant du bromure d'éthidium (BET, 1 µL pour 80 mL d'agarose, Euromedex #EU0070). Les échantillons sont déposés sur le gel après ajout de 4 µL de tampon de charge (Thermo Scientific™ #R1161) et migrent pendant 30 min à 130V. Le gel est ensuite révélé sous ultra-violets. Ci-dessous la **Table 6** récapitulant les bandes obtenues en fonction du génotype pour les deux lignées souris utilisées.

Lignée	Taille de la bande sauvage	Taille de la bande mutante
Tg(<i>Dyrk1a</i>)	230 pb	180 pb
Dp1Yey	324 pb	200 pb

Table 6 : Récapitulatif de la taille des bandes observées après migration sur gel d'agarose.

2. Génotypage des modèles rats

Les modèles rats du SD ont été génotypés avec la technique de PCR digitale en gouttelettes, en anglais « *droplet digital PCR* » (ddPCR) par le Service de Validation des Modèles et le Service de Génotypage de l'ICS. La ddPCR est une méthode de PCR numérique permettant de quantifier directement les copies d'ADN avec un degré de précision élevé. Cette technique ne nécessite pas de courbe standard ou d'un haut degré d'efficacité d'amplification et permet la mesure du nombre de copies d'un gène. Dans nos conditions, le nombre de copie du gène de l'APP^H est vérifié dans le but d'identifier la présence ou l'absence de la duplication du Rno11. Il est également nécessaire de réaliser une ddPCR pour la duplication de la région du Rno20 en dosant le nombre de copies du gène *Abcg1* localisé sur le Rno20.

2.1 Extraction d'ADN pour la ddPCR

Le kit DNA Extract All Reagents (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific) est utilisé pour réaliser l'extraction de l'ADN à partir des biopsies des modèles Dup(Rno11)-APP^{H3}, Dup(Rno11-20)-APP^{H3} et l'APP^{H2}. Concernant la digestion tissulaire, les biopsies sont mises en

présence de 50 µL de tampon de lyse et sont incubées à 95°C pendant 10 min. À la fin de la digestion tissulaire, les échantillons sont supplémentés de 50 µL de solution neutralisante (Lindner et al. 2021).

2.2 Protocole de la ddPCR

Pour la réaction de PCR, 2 µL des échantillons dilués au 1/20^{ème} sont supplémentés de 10 µL du Supermix ddPCR 2x (sans dUTP, Bio-Rad, #1863024), de 250 nM de chaque sonde couplée à un fluorophore (HEX), l'une dirigée contre le gène d'intérêt et l'autre contre le gène de référence. Une quantité de 750 nM de chaque amorces (deux amorces par gènes étudiés) est également ajoutée aux mix pour un volume final de 20 µL par échantillon (Lindner et al. 2021). Une fois préparés, les échantillons sont fractionnés sous forme de gouttelettes grâce au générateur de gouttelettes QX200 (Bio-Rad). La réaction de PCR peut alors être effectuée en déposant 40 µL des échantillons sur une plaque 96 puits. L'ADN contenu dans les gouttelettes est amplifié selon les conditions décrites dans la **Table 7**. L'intensité de fluorescence de chaque gouttelette est ensuite mesurée avec le lecteur QX200 (Bio-Rad). Les données sont analysées avec le logiciel Quantasoft™ Analysis Pro (Version 1.0.596).

	Température	Temps	Nombre de cycles
	95°C	10 min	1
	95°C	20 s	40
Gradient d'hybridation	53 à 63°C	1 min	1
	98°C	10 min	1

Table 7 : Condition de la ddPCR pour la duplication du Rno11.

S'agissant du génotypage des modèles rats du SD utilisés dans ce projet, deux ddPCR ont été utilisées : l'une pour révéler la duplication de la région du Rno11 en analysant le nombre de copies d'APP^H et l'autre pour révéler la duplication de la région du Rno20.

2.3 Génotypage de la duplication du Rno11 et du nombre de copies d'APP^H

Pour mettre en évidence la duplication du Rno11 et l'APP^H dans nos modèles, le gène cible sélectionné est l'*App* et le gène de référence est localisé en q21 (**Table 8**).

		Nom	Séquence
Gène cible <i>App</i>	Amorces	Rr5480_rApp Forward	5'- GTG AAG ATG GAT GCG GAG TT -3'
		Rr5480_rApp Reverse	5'- CTA TCT GGC CAG TCA GTT GTG -3'
	Sonde	Rr5480_rApp_PM	5'- TCA GGC TAC GAA GTC CAC CAT CAA -3' Fluorophore HEX
Gène de Reference q21	Amorces	Rn_Chro11q21 Forward	5'- CCC TAG ACA CCA GAA GAA TAG TG - 3'
		Rn_Chro11q21 Reverse	5'- CGT CTG GTA GTA CTT GTC GTA AG - 3'
	Sonde	Rn_Chro11q21	5'- TGT TTG CAG AAT GGC GTC TTC ACC -3' Fluorophore HEX

Table 8 : Séquences des amorces et des sondes pour le génotypage par ddPCR de la duplication de la région du Rno11 et de l'APP^H.

Le gène *App* est utilisé comme gène cible et l'utilisation des deux sondes (Rr5480_rApp_WT et Rr5480_rApp_PM) permet de vérifier le nombre de copies d'APP^{wt} versus APP^H pour le génotypage de la duplication de la région du Rno11. Le gène de référence est localisé en q21.

2.4 Génotypage de la duplication du Rno20

Afin d'identifier la duplication de la région du Rno20, le gène cible utilisé, *Abcg1*, est présent sur la région dupliquée du Rno20. Le gène de référence utilisé est le gène *Glyoxalase I (Glo1)* (**Table 9**).

		Nom	Séquence
Gène cible <i>Abcg1</i>	Amorces	Rr5758_5'_rAbcg1 Forward	5'- GGC ATG TGT GAC TCT GAC TAT AA -3'
		Rr5758_5'_rAbcg1 Reverse	5'- GGC CTC TCC AAA CCT TCT TTA -3'
	Sonde	Rr5758_5'_rAbcg1	5'- AGA CGT GAA CCC GTT CCT CTG G - 3' Fluorophore FAM
Gène de référence <i>Glo1</i>	Amorces	Rn_Chro20_rGlo1 Forward	5'- AAG GAC AAG ACG GAG AGG A -3'
		Rn_Chro20_rGlo1 Reverse	5'- GGA CTG GTG AGC AGA GAA TAA A -3'
	Sonde	Rn_Chro20_rGlo1	5'- TGT TTC CAT CTC TTT CCG CAG CCT -3' Fluorophore HEX

Table 9 : Séquences des amorces et des sondes utilisées pour le génotypage par ddPCR de la duplication de la région du Rno20.

Le gène cible *Abcg1* est utilisé pour le génotypage de la duplication de la région du Rno20. Le gène *Abcg1* présent dans la région dupliquée, est donc trisomique. Le gène de référence utilisé est le gène *Glo1*.

III. Traitements aux Leucettinibs

1. Description et préparation des traitements

Les inhibiteurs de la kinase DYRK1A testés dans ce projet sont des Leucettinibs dérivées de la Leucettamine B qui est extraite de l'éponge calcaire *Leucetta microraphis* (**Figure 17**). Les molécules sont synthétisées par l'équipe du Dr. Laurent Meijer de ManRos Therapeutics, Roscoff, France.

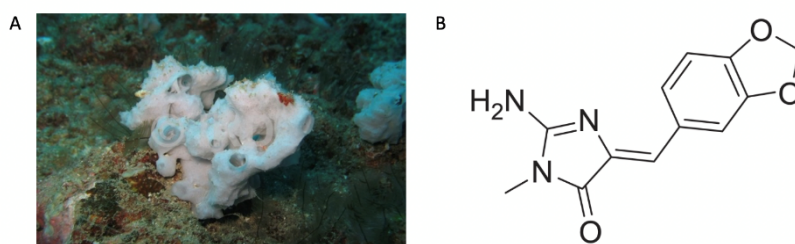


Figure 17 : Image d'une éponge de calcaire, la *Leucetta microraphis* (A) et structure chimique de la Leucettamine B.

Images issues de « *Encyclopedia of Life* » et de la revue du Dr. Nguyen (Nguyen et al. 2017).

Les Leucettinibs utilisées sont : l'EMD10, l'EMD92 ainsi que l'EMD173 également appelé Leucettinb-21 (LTCB21). Nos collaborateurs de ManRos Therapeutics ont vérifié le devenir des leucettinibs dans l'organisme après leur administration (ADME, absorption, distribution, métabolisme, excrétion du principe actif et de ses métabolites). Les leucettinibs ont été sélectionnés par nos collaborateurs et testés par notre équipe dans l'ordre suivant : EMD10 avec une concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) de 20.3 nM, EMD92 avec une IC₅₀ de 1.2 nM et l'EMD173 avec une IC₅₀ de 2.4 nM. Les produits sont réceptionnés sous forme de poudre et sont stockés à l'obscurité à température ambiante jusqu'à la mise en suspension. Ces inhibiteurs de DYRK1A sont mis en suspension quotidiennement avant le début du traitement dans du carboxyméthylcellulose (CMC, aussi nommé carmellose) à 0,5%. Le CMC à 0,5% est préparé antérieurement avec de l'eau de boisson des animaux. La solution véhicule est composée uniquement de CMC à 0,5%. Une fois avant chaque étude, le potentiel hydrogène (pH) de la solution à administrer est vérifié pour valider la neutralité du pH. La pesée d'inhibiteur de DYRK1A nécessaires pour le traitement des animaux pour une journée a été réalisée le nombre de fois qu'il y a de jours de traitements dans une étude et ceci avant le début de l'étude. Par exemple, pour une étude de 19 jours, 19 pesées distinctes ont été effectuées dans 19 tubes différents avant le début de l'étude.

2. Administration du traitement

Les dérivés de la L41 testés dans ce projet ont l'avantage de traverser la barrière hémato-encéphalique et intestinale. De ce fait, les traitements ont été administrés aux animaux par gavage oral. Le gavage oral a été réalisé à l'aide de sondes de gavage métalliques courbées pour le traitement des souris et des rats.

Concernant les études réalisées sur les modèles souris du SD, la concentration des inhibiteurs de DYRK1A dépend de l'étude menée. En effet, certaines des études ont été réalisées avec une dose de 3 mg de Leucettinib/kg et d'autres avec 0.3 mg Leucettinib/kg. Dans le cas d'une étude réalisée avec une dose de 3 mg/kg, la concentration de la solution d'inhibiteur de DYRK1A préparée est de 0.4 mg/mL. Pour les études réalisées à une dose de 0.3 mg/kg quotidienne, le traitement est préparé à une concentration de 0.04 mg de Leucettinib/mL. Afin de bien adapter la quantité de traitement administrée, les animaux sont pesés quotidiennement et le volume administré par gavage oral est adapté en fonction de la masse corporelle de l'animal. Le volume administré pour le traitement des souris peut varier de 140 à 260 μ L, pour cela une seringue de 1 mL est utilisée (**Table 10**).

Masse corporelle (g)	Volume administré (μ L)	Masse corporelle (g)	Volume administré (μ L)
19	140	26,5	200
19,5		27	
20	160	27,5	
20,5		28	220
21		28,5	
21,5		29	
22		29,5	
22,5		30	
23	180	30,5	240
23,5		31	
24		31,5	
24,5		32	
25	32,5		
25,5	200	33	260
26		33,5	

Table 10 : Volumes administrés en fonction de la masse corporelle des modèles souris du SD.

Concernant l'étude menée sur les modèles rats du SD, une dose de 0.5 mg/kg a été administrée quotidiennement aux animaux. Le traitement a été préparé à une concentration de 0.1 mg de Leucettinib/mL. Les animaux ont été pesés tous les deux à trois jours et le volume de traitement a été adapté en fonction de la masse corporelle des rats (**Table 11**). Le volume administré par gavage oral peut varier entre 1.2 à 3.2 mL avec des seringues de 1.5 et 5 mL.

Masse corporelle (g)	Volume administré (mL)	Masse corporelle (g)	Volume administré (mL)
230	1,2	440	2,2
240		450	2,3
250	1,3	460	
260		270	470
270	1,4	480	2,5
280		490	
290	1,5	500	2,6
300		510	
310	1,6	520	2,7
320		530	
330	1,7	540	2,8
340		550	
350	1,8	560	2,9
360		570	
370	1,9	580	3
380		590	
390	2	600	3,1
400		610	
410	2,1	620	3,2
420		630	
430	2,2	640	

Table 11 : Volumes administrés en fonction de la masse corporelle des modèles rats du SD.

3. Chronologie des études des inhibiteurs de DYRK1A sur les modèles rongeurs du SD

3.1 Étude des Leucettinibs sur les modèles souris du SD

Au total, cinq études ont été effectuées avec les nouveaux inhibiteurs de DYRK1A sur les modèles souris du SD afin d'optimiser au mieux le traitement des animaux. Un ou plusieurs paramètres ont été modifiés pour chacune des cinq études. Ces paramètres sont les suivants : la Leucettinib testée, le modèle utilisé, la durée ainsi que la dose du traitement. La partie suivante décrit les cinq études réalisées sur les modèles souris du SD et les tests comportementaux cités sont détaillés dans la partie IV. Tests comportementaux. Les animaux étaient âgés de 9 à 12 semaines au début de chaque étude de traitement.

3.1.1. Étude de l'EMD10 sur le modèle Tg(*Dyrk1a*) pendant 19 jours de traitement

La première étude a été réalisée sur la lignée Tg(*Dyrk1a*) traitée 19 jours avec la première Leucettinib, l'EMD10 à une dose de 3 mg/kg (**Figure 18**). À partir du 15^{ème} jour de traitement, une batterie de tests comportementaux a été réalisée en parallèle du traitement afin de mesurer l'impact des inhibiteurs de la kinase DYRK1A sur les déficits cognitifs des animaux. Au 15^{ème} et 16^{ème} jour de traitement, une habituation à l'arène (en anglais « *Open Field* », OF) est réalisée et la distance parcourue sur les deux jours est analysée. Le 17^{ème} jour de traitement correspond à la présentation des objets pour le test de la reconnaissance de position d'un objet « *Object Place Preference* » (OPP) et le test de reconnaissance du nouvel objet, « *Novel Object Preference* » (NOP) qui sont réalisés respectivement aux jours 18 et 19 de l'étude. Les animaux sont mis à mort au dernier jour de l'étude (pour plus de détails voir la section VI. 1. Mises à mort des souris). Pour réaliser cette étude, un total de 4 cohortes de 95 animaux ont été générés et les deux sexes ont été utilisés. Les effectifs des animaux par groupe et par sexe sont résumés dans la **Table 12**.

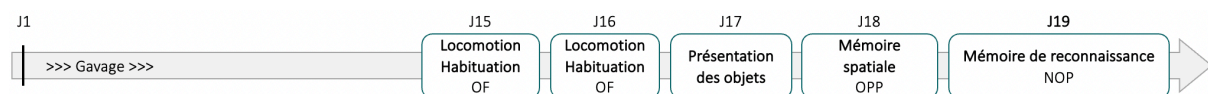


Figure 18 : Chronologie de l'étude de l'EMD10 sur le modèle Tg(*Dyrk1a*) pendant 19 jours de traitements.

Dans cette étude les souris ont été quotidiennement traitées avec l'EMD10 pendant 19 jours (noté J sur la frise chronologique). À partir du 15^{ème} jour de traitement, les tests comportementaux débutent en parallèle du traitement avec deux jours consécutifs de test du champ ouvert (OF). Le 17^{ème} jour correspond à la phase de présentation des objets. Les tests OPP et NOP sont réalisés respectivement au 18^{ème} et 19^{ème} jour.

Groupe	Mâles	Femelles	Total
wt	12	11	23
wt – EMD10	12	12	24
Tg(<i>Dyrk1a</i>)	12	12	24
Tg(<i>Dyrk1a</i>) – EMD10	12	12	24

Table 12 : Effectif des animaux par groupe et par sexe pour l'étude de l'EMD10 sur le modèle Tg(*Dyrk1a*) pendant 19 jours de traitements.

Les groupes recevant la solution véhicule sont notés uniquement par leur génotype. Quand le traitement est administré dans un groupe, le nom du groupe est défini par son génotype suivi du nom de la Leucettinb testée.

3.1.2. Étude de l'EMD10 sur le modèle Tg(*Dyrk1a*) pendant 10 jours de traitement

La seconde étude a été effectuée de la même manière que l'étude précédente, mais avec une durée de traitement réduite à 10 jours (**Figure 19**). La batterie de tests comportementaux utilisés est la même que pour la première étude, avec le premier jour d'habituation à l'arène au 6^{ème} jour de traitement et le test du NOP au dernier jour de traitement, soit le 10^{ème} jour. Les souris ont été mises à mort au 10^{ème} jour de l'étude suite au test du NOP (pour plus d'information voir la section VI. 1. Mise à mort des souris). Cette étude a été effectuée avec 2 cohortes composées de chacune de 46 souris (mâles et femelles). Les effectifs des animaux par groupe et par sexe sont détaillés dans la **Table 13**.

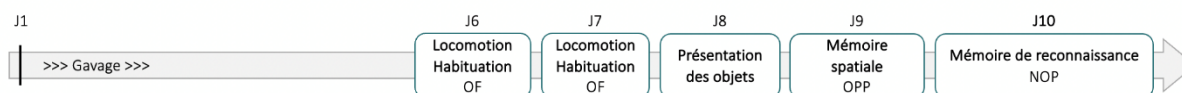


Figure 19: Chronologie de l'étude de l'EMD10 sur le modèle Tg(Dyrk1a) pendant 10 jours de traitement.

Les souris ont été quotidiennement traitées avec l'EMD10 pendant 10 jours (noté J sur la frise chronologique). À partir du 6^{ème} jour de traitement, les tests comportementaux débutent en parallèle du traitement avec deux jours consécutifs d'OF. Le 8^{ème} jour correspond à la phase de présentation des objets. Les tests d'OPP et de NOP sont réalisés respectivement au 9^{ème} et 10^{ème} jour.

Groupe	Mâles	Femelles	Total
wt	6	6	12
wt – EMD10	6	6	12
Tg(<i>Dyrk1a</i>)	6	6	12
Tg(<i>Dyrk1a</i>) – EMD10	6	4	10

Table 13 : Effectif des animaux par groupe et par sexe pour l'étude de l'EMD10 sur le modèle Tg(*Dyrk1a*) pendant 10 jours de traitement

3.1.3. Étude de l'EMD92 sur le modèle Tg(*Dyrk1a*) pendant 10 jours de traitement

Pour la troisième étude, un second inhibiteur de DYRK1A a été fourni par l'équipe du Dr. Laurent Meijer : l'EMD92. Cette Leucettinib a été testée sur le modèle Tg(*Dyrk1a*) pendant 10 jours à 0.3 mg/kg (Figure 20). Les tests comportementaux utilisés sont les mêmes que pour l'étude précédente. Cependant, ici, le test du labyrinthe en Y a été ajouté avant les deux jours d'habituation à l'arène. La batterie de tests débute donc au 5^{ème} jour de traitement. Les souris ont été mises à mort après leur passage dans le dernier test le 10^{ème} jour. Cette étude a été menée sur 4 cohortes et le nombre d'animaux par groupe et par sexe est repris dans la Table 14.

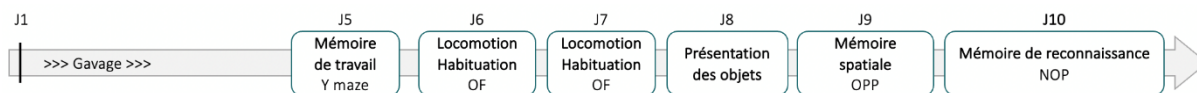


Figure 20: Chronologie de l'étude de l'EMD92 sur le modèle Tg(Dyrk1a).

Les souris ont été quotidiennement traitées avec le second inhibiteur de DYRK1A, l'EMD92 pendant 10 jours (noté J sur la frise chronologique). Les tests comportementaux débutent au 5^{ème} jour de traitement avec le test du labyrinthe en Y, en anglais « *Y maze* ». Les 6^{ème} et 7^{ème} jours de traitement correspondent au test d'OF. Le 8^{ème} jour correspond à la phase de présentation des objets. Les tests d'OPP et du NOP sont réalisés respectivement au 9^{ème} et 10^{ème} jour.

Groupe	Mâles	Femelles	Total
wt	12	12	24
wt – EMD92	12	12	24
Tg(<i>Dyrk1a</i>)	12	12	24
Tg(<i>Dyrk1a</i>) – EMD92	12	12	24

Table 14 : Effectif des animaux par groupe et par sexe au cours de l'étude de l'EMD92 sur le modèle Tg(*Dyrk1a*) pendant 10 jours de traitement.

3.1.4. Étude de l'EMD92 sur le modèle Dp1Yey pendant 11 jours de traitement

La quatrième étude a consisté à tester l'EMD92 sur un modèle plus complet du SD, le modèle Dp1Yey. Le traitement a été effectué pendant 11 jours à une dose de 0.3 mg/kg (**Figure 21**). La chronologie des tests comportementaux réalisés au cours de cette étude est identique à celle de la précédente étude avec au 5^{ème} jour, le test du labyrinthe en Y et au 10^{ème} jour le test de NOP. Le traitement est prolongé d'un jour par rapport aux précédentes études afin de réaliser une analyse d'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf). Les animaux ont été mis à mort après leur passage en IRMf. Les études d'IRMf mettent en évidence des différences d'activité cérébrale entre les mâles et femelles, par conséquent, seules les souris

mâles ont été utilisées au cours de cette étude afin d'éviter l'influence des cycles hormonaux (Hjelmervik et al. 2014). Trois cohortes de la lignée Dp1Yey ont été générées et les effectifs par groupe sont détaillés dans la **Table 15**.

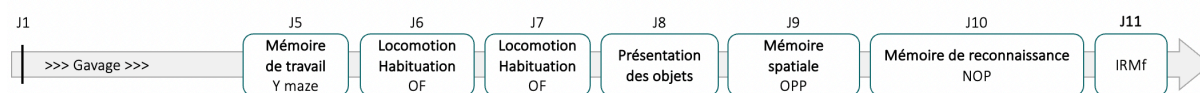


Figure 21: Chronologie de l'étude de l'EMD92 sur le modèle Dp1Yey.

Pour cette dernière étude, les souris ont été quotidiennement traitées avec l'EMD92 pendant 10 jours (noté J sur la frise chronologique). Les tests comportementaux débutent au 5^{ème} jour de traitement avec le test du labyrinthe en Y. Les 6^{ème} et 7^{ème} jours de traitement correspondent au test de l'OF. Le 8^{ème} jour correspond à la phase de présentation des objets. Les tests de l'OPP et du NOP sont réalisés respectivement au 9^{ème} et 10^{ème} jour. Le 11^{ème} jour correspond à l'IRMf.

Groupe	Mâles
wt	14
wt – EMD92	14
Dp1Yey	14
Dp1Yey – EMD92	14

Table 15 : Effectif des animaux par groupe au cours de l'étude de l'EMD92 sur le modèle Dp1Yey pendant 11 jours de traitement.

3.1.5. Étude de l'EMD173 sur le modèle Dp1Yey pendant 11 jours de traitement

Enfin pour la cinquième étude sur les modèles souris, l'EMD173, sélectionné pour passer sur les études cliniques par nos collaborateurs de Manros Therapeutics, a été testé. Le traitement a été réalisé sur le modèle Dp1Yey pendant 11 jours avec deux doses de traitements, 0.3 et 3 mg/kg (**Figure 22**). La batterie de tests comportementaux débute au 7^{ème} jour de traitement avec les deux jours d'habituation à l'arène, et se termine au 10^{ème} jour de traitement

avec le test NOP. Un jour supplémentaire de traitement a été nécessaire afin de réaliser la mise à mort des animaux au 11^{ème} jour. Un total de trois cohortes a été utilisé pour cette étude. Les effectifs par groupe et par sexe sont détaillés dans la **Table 16**.

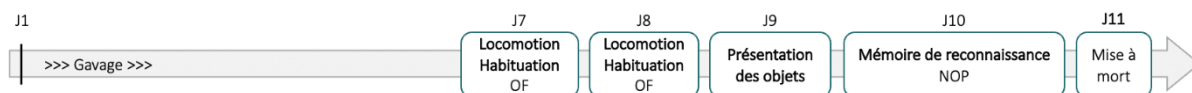


Figure 22 : Chronologie de l'étude de l'EMD173 sur le modèle Dp1Yey.

Pour cette dernière étude, les souris ont été quotidiennement traitées avec le troisième inhibiteur de DYRK1A, l'EMD173, pendant 11 jours (noté J sur la frise chronologique). Les tests comportementaux débutent au 7^{ème} jour de traitement avec deux jours de test OF. Le 9^{ème} jour correspond à la phase de présentation des objets et le test du NOP a été réalisé au 10^{ème} jour.

Groupe	Mâles	Femelles	Total
wt	8	8	16
Dp1Yey	8	6	14
Dp1Yey – EMD173 à 0.3 mg/kg	6	6	12
Dp1Yey – EMD173 à 3 mg/kg	8	6	14

Table 16 : Effectif des animaux par groupe et par sexe au cours de l'étude de l'EMD173 sur le modèle Dp1Yey pendant 11 jours de traitement.

3.2 Étude de l'EMD173 sur les modèles rats du SD

L'EMD173 testé dans un premier temps sur le modèle souris Dp1Yey a ensuite été testé sur les modèles rats du SD. Les modèles rats Dup(Rno11)-APP^{H3} et Dup(Rno11-20)-APP^{H3} présentent tous les deux des déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale dans le test de la piscine de Morris (en anglais « *Morris water maze* »). Ce test étant plus long à réaliser dans le temps, la durée du traitement des modèles rats du SD a été prolongée de deux à trois jours par rapport au modèle souris Dp1Yey. Le protocole détaillé du test de la piscine de Morris est décrit en partie IV. Tests comportementaux.

Dans cette étude, l'EMD173 a été administré par gavage oral aux animaux à une dose de 0.5 mg/kg. La chronologie de cette étude est représentée dans la **Figure 23**. Le test de la piscine de Morris débute au 2^{ème} jour de traitement avec une phase d'habituatation. Au 5^{ème} jour de traitement commence la phase d'acquisition du test (réalisée sur 5 jours consécutifs), suivie au 10^{ème} jour de traitement par la phase de rappel. Le test de la piscine de Morris se termine au 11^{ème} jour de traitement avec le test de la plateforme indiquée. La mise à mort des animaux a été effectuée aux 12^{ème} et 13^{ème} jours (plus de détails dans la partie VI. 2. Mise à mort des rats). Certains animaux ont donc été traités 12 jours, d'autres 13 jours. Cette étude a été réalisée sur un total de 5 cohortes composées de rats mâles et femelles dans chaque groupe. Les effectifs par groupe et par sexe sont résumés dans la **Table 17**.

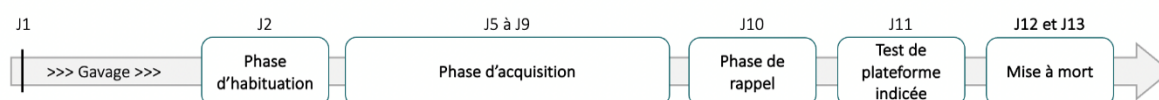


Figure 23: Chronologie de l'étude de l'EMD173 sur les modèles rats du SD.

Les rats ont été quotidiennement traités avec l'EMD173 durant 12 à 13 jours (noté J sur la frise chronologique). Le test de la piscine de Morris débute au 2^{ème} jour de traitement avec la phase d'habituatation. Au 5^{ème} jour de l'étude commence la phase d'acquisition du test qui est réalisée sur 5 jours consécutifs. Le test de rappel est réalisé le lendemain du dernier jour d'acquisition. Le test de la piscine de Morris se termine au 11^{ème} jour de l'étude avec le test de la plateforme indiquée. Les animaux sont mis à mort les deux derniers jours de l'étude.

Groupe	Mâles	Femelles	Total
APP ^{H2}	12	12	24
APP ^{H2} – EMD173	12	12	24
Dup(Rno11)-APP ^{H3}	11	12	23
Dup(Rno11)-APP ^{H3} – EMD173	12	12	24
Dup(Rno11-20)-APP ^{H3}	12	11	23
Dup(Rno11-20)-APP ^{H3} – EMD173	12	12	24

Table 17 : Effectif par groupe et par sexe au cours de l'étude de l'EMD173 sur les modèles rats du SD.

IV. Tests comportementaux

1. Phase d'habituation à l'expérimentateur

Pendant une semaine avant le début d'une étude, les souris et rats sont manipulés tous les jours afin de les habituer à la présence et au contact de l'expérimentateur pour ainsi éviter tout biais durant les tests comportementaux.

2. Analyse comportementale chez les modèles souris du syndrome Down

2.1 Labyrinthe en Y

Le labyrinthe en Y permet de mesurer la mémoire de travail en étudiant l'alternance spontanée des animaux. Ce test est basé sur le comportement inné des souris à explorer un bras non visité au préalable.

Dispositif

Le dispositif est composé de trois bras de taille identique se rejoignant au niveau d'une plateforme centrale (**Figure 24**). Les bras du dispositif sont recouverts d'un papier blanc opaque sur lesquels des motifs différents sont présents (nuages, triangles et rayures en diagonale). La luminosité de la pièce est réglée à une intensité de 100 lux au centre du dispositif. Le test est enregistré à l'aide d'une caméra reliée à un ordinateur permettant de suivre le comportement des souris en temps réel avec le système EthoVision XT (Wegeningue, Pays-Bas).

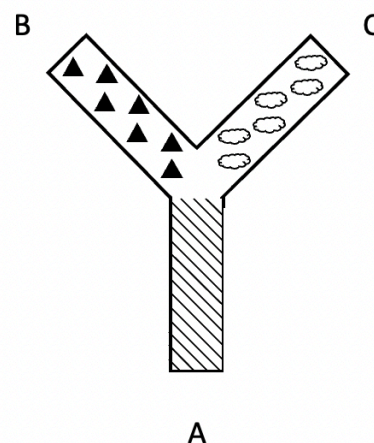


Figure 24: Dispositif du labyrinthe en Y

Protocole

Pour la réalisation du test, les souris sont déposées dans l'un des trois bras, la tête dirigée vers la paroi. Le point de départ est modifié aléatoirement entre les différents groupes. Chaque animal réalise un essai unique de 8 min et la séquence d'entrée dans les bras est notée. Une entrée dans un bras est prise en compte lorsque les quatre pattes de l'animal sont dans le bras. Le taux d'alternance spontanée est quantifié à partir de la séquence d'entrée dans les bras.

$$\% \text{ Alternance spontanée} = \left(\frac{n}{N - 2} \right) * 100$$

Avec n = nombre total d'alternances réalisées (visite de 3 bras consécutifs) et N = nombre total de bras visités. La latence de sortie du bras de départ et le nombre d'entrées dans les bras sont aussi quantifiés.

2.2 Test du champ ouvert

Le test du champ ouvert permet l'habituation à l'arène pour les tests de l'OPP et du NOP. De plus, ce test permet aussi d'évaluer l'activité locomotrice et exploratoire ainsi que l'anxiété liée à un nouvel environnement.

Dispositif

L'OF a été réalisé dans une enceinte carrée avec des parois grises opaques de dimensions 44 x 44 x 38 cm. L'arène comporte un repère spatial qui correspond à une bande blanche traversant horizontalement une des parois pour le test de l'OPP. L'arène est placée dans une pièce d'expérimentation éclairée à 40 lux au centre de l'enceinte. Une caméra placée au-dessus de l'arène et reliée à un ordinateur, permet l'enregistrement vidéo des déplacements des souris.

Protocole

Le test est réalisé sur deux jours. Chaque jour, les souris réalisent un essai unique de 15 min. Toutes les souris sont déposées dans le dispositif la tête dirigée vers la paroi qui est à l'opposé de l'indice spatial. Le dispositif est nettoyé à l'alcool 70% entre chaque animal afin de diminuer les informations olfactives. Le logiciel EthoVision XT (Wegeningue, Pays-Bas) permet

d'enregistrer différents paramètres : la distance parcourue, permettant d'évaluer l'activité locomotrice, et le temps passé à la périphérie *versus* celui passé au centre du dispositif qui est un indicateur d'anxiété.

2.3 Test de reconnaissance de la position d'un objet

Le test de l'OPP est basé sur le comportement naturel des rongeurs à explorer plus longtemps un objet qui aurait changé de position par rapport à un objet identique qui n'a pas été déplacé. Ce test permet de mesurer la mémoire spatiale à court terme chez les souris.

Dispositif

Le test de l'OPP a été réalisé dans la même enceinte carrée que celle utilisée pour le test d'OF qui sert d'habituation des animaux à l'arène (**Figure 25**). Une bande blanche traversant horizontalement l'une des parois sert de repère spatial permettant aux animaux de se localiser dans le dispositif. L'arène est placée dans une pièce d'expérimentation éclairée à 40 lux au centre de l'enceinte. Les objets utilisés sont une paire de dés ou de billes. La caméra placée au-dessus de l'arène est reliée à un ordinateur permettant de suivre le comportement des souris en temps réel.

Protocole

Après deux jours d'habituation à l'arène carrée, la phase de présentation des objets débute. Une paire d'objets identiques (dés ou billes) est présentée à chaque souris pendant 14 min (**Figure 25**). Dans l'enceinte, l'un des deux objets est fixé à droite ou à gauche de la bande blanche à une distance de 7 cm du bord de la paroi où est situé le repère spatial. Le second item est positionné à l'opposé du premier, soit à une distance de 7 cm du mur opposé à celui du repère. La phase de test débute après 24h de rétention. Au cours de la phase de test, l'item situé du côté opposé au repère spatial est déplacé à gauche ou à droite du repère à équidistance de celle-ci avec l'objet qui n'a pas été déplacé. La souris est libre d'explorer les objets durant 14 min. L'arène et les objets sont nettoyés entre chaque passage de souris avec de l'alcool à 70%. La nature des objets et l'emplacement sont randomisés par rapport au génotype et au traitement afin d'éviter tout biais. L'expérimentateur utilise le logiciel EthoVision XT (Wegeningue, Pays-Bas) afin de mesurer le temps d'exploration de différents

objets par les souris. L'exploration d'un objet est prise en compte lorsque le museau de l'animal est dirigé vers l'objet à une distance inférieure ou égale à 2 cm.

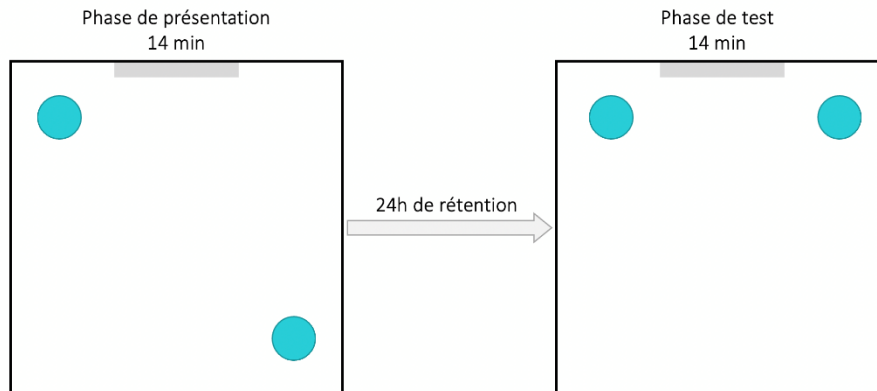


Figure 25 : Représentation schématique du protocole du test de l'OPP.

Au cours de la phase de présentation, deux objets identiques (billes ou dés, cercle bleu) sont présentés aux animaux qui sont libres d'explorer les objets pendant 14 min. La phase test débute 24h après la présentation. L'un des objets est déplacé et les animaux sont libres de prendre connaissance des deux objets pendant 14 min.

2.4 Test de reconnaissance du nouvel objet

Le test de NOP est basé sur la tendance naturelle des rongeurs à explorer plus longtemps un objet nouveau par rapport à un objet familier. Ce test permet d'évaluer la mémoire de reconnaissance chez les souris.

Dispositif

Le test de NOP est réalisé dans la même arène carrée que l'OF et le test de l'OPP. L'indice spatial présent dans l'arène n'est pas enlevé afin de ne pas modifier l'environnement auquel sont habitués les animaux. L'enceinte carrée est éclairée à une intensité lumineuse de 40 lux au centre de l'arène. Les objets utilisés restent les mêmes. La caméra placée au-dessus de l'arène est reliée à un ordinateur permettant de suivre le déplacement et le comportement des animaux en temps réel.

Protocole

Le test de NOP débute par une phase de présentation des objets. Dans le cadre de notre étude, la phase de présentation pour le test de NOP correspond à la phase test de l'OPP (**Figure 26**) durant laquelle la souris a été en présence de deux objets identiques. 24h après le test de l'OPP, la phase de test de NOP est réalisée. Pour cette phase, l'un des deux items familiers est remplacé par un nouvel item (un dé si des billes ont été présentées et inversement). Les animaux sont libres d'explorer les deux objets (l'objet familier et le nouvel objet) durant 14 min. Les souris sont placées dans l'arène, la tête dirigée vers la paroi. Le choix des objets et l'emplacement du nouvel objet (à droite ou à gauche) est randomisé par rapport au génotype et au traitement. Chacun des objets et l'arène sont nettoyés à l'éthanol 70% entre chaque souris afin de réduire les odeurs et éviter des biais. Le logiciel EthoVision XT (Wegeningue, Pays-Bas) permet de mesurer le temps passé à explorer chacun des objets. Un animal est considéré comme explorant l'un des objets lorsque son museau est dirigé vers l'objet en question à une distance égale ou inférieure à 2 cm.

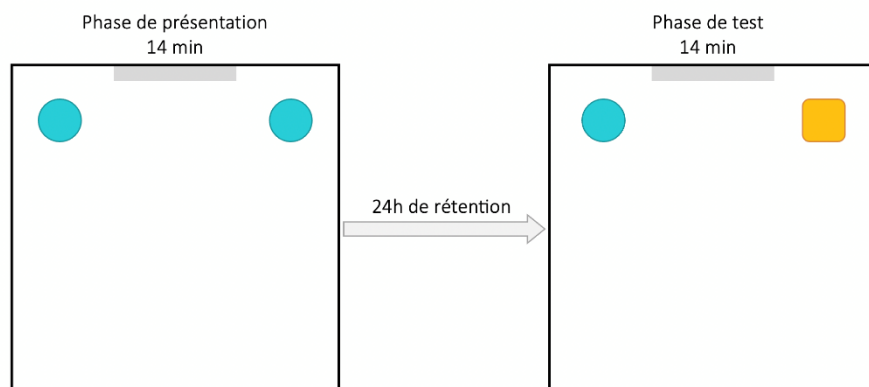


Figure 26 : Représentation schématique du protocole du test du NOP.

Au cours de la phase de présentation deux objets identiques (billes ou dés, cercle bleu) sont présentés aux animaux qui sont libres de prendre connaissance des objets pendant 14 min. La phase test débute 24h après la présentation. L'un des objets familiers est changé par un nouvel objet (dés ou billes, carré orange) et les animaux sont libres d'explorer les objets durant 14 min.

3. Analyse comportementale chez les modèles rats du syndrome de Down : le test de la piscine de Morris

3.1 Dispositif de la piscine de Morris

La piscine utilisée pour ce test est circulaire en PVC blanc avec un diamètre de 160 cm et une hauteur de 80 cm (**Figure 27**). La plateforme localisée dans le quadrant Nord-Est (NE) de la piscine est constituée d'un disque de couleur noire et de 10 cm de diamètre. L'eau de la piscine, maintenue à $21\pm 1^\circ\text{C}$, est opacifiée grâce à une peinture à eau de couleur noire (Gouache Redimix Noire #188039, Le Franc Bourgeois). La luminosité de la salle d'expérimentation est réglée à 70 lux au niveau de la plateforme. Des indices allothétiques ont été placés dans la salle permettant ainsi la localisation spatiale des animaux lors du test. Une caméra localisée au-dessus de la piscine et reliée à un ordinateur permet de suivre le comportement des animaux en temps réel. L'eau de la piscine est changée entre le passage de chaque cohorte.

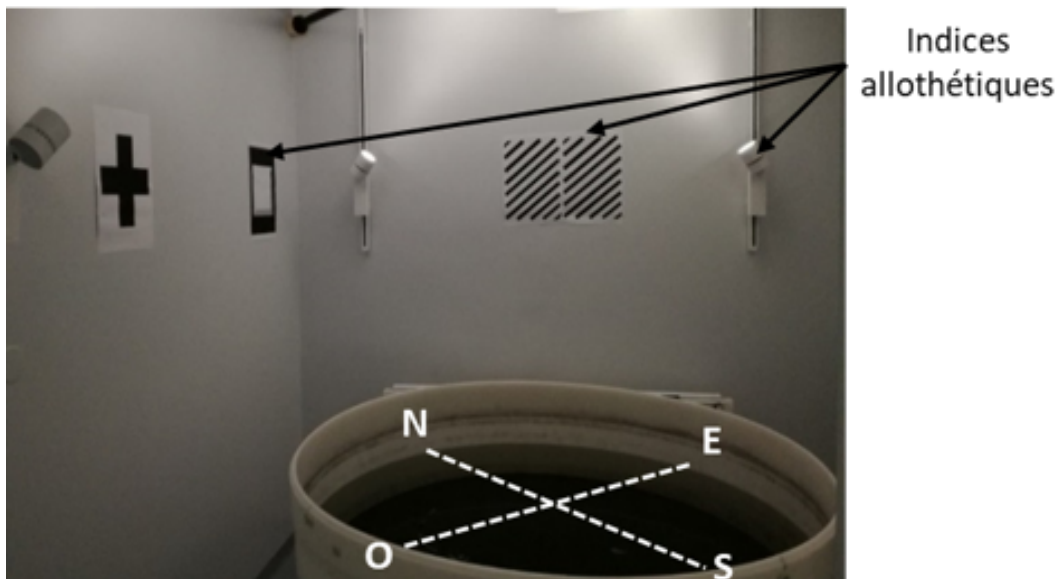


Figure 27 : Dispositif de la piscine de Morris

La piscine est divisée en 4 quadrants virtuels délimités par les points : Nord (N), Est (E), Sud (S) et Ouest (O). Lors de la phase d'acquisition, ces points correspondent aux points de lâcher des animaux et la plateforme est localisée dans le quadrant NE.

3.2 Protocole de la piscine de Morris

La **Figure 28** représente le protocole du test de la piscine de Morris. Au cours de ce test, les cohortes sont réparties en groupe de minimum 4 et maximum 6 rats. Les mâles et les femelles sont dans des groupes distincts. Environ 30 minutes avant le début du test, les rats sont placés dans des cages individuelles dans l'antichambre de la pièce. Le test est réalisé en quatre phases : l'habituation, l'acquisition, le rappel et la phase de plateforme indiquée également nommée « cue ». Les différentes étapes du test de la piscine de Morris sont détaillées ci-dessous.

Le premier jour du test correspond à la **phase d'habituation** des rats au dispositif et à l'eau fraîche. Les indices allothétiques de la pièce sont cachés à l'aide d'un rideau blanc placé autour de la piscine et la plateforme est absente de la piscine. Les rats effectuent un unique essai d'une durée de 1 min. Ils sont lâchés au point S, la tête dirigée vers la paroi. Le logiciel EthoVision XT (Wegeningue, Pays-Bas) permet de mesurer la vitesse et la distance de nage.

Le deuxième jour du test correspond au début de la **phase d'acquisition** qui est réalisée sur 5 jours. Au cours de cette phase, les indices allothétiques sont visibles et la plateforme est placée au centre du quadrant NE, immergée 3 cm sous la surface de l'eau opacifiée par la peinture noire. Chaque rat réalise 4 essais d'une durée maximale de 1 min par jour. Comme expliqué précédemment, les animaux sont répartis par groupe et tous les animaux du groupe effectuent le premier essai avant de passer au second essai et ainsi de suite. Pour le point de départ des essais, une séquence aléatoire aux points N, S, E et O est effectuée chaque jour. Cette séquence est randomisée pour chaque groupe. L'essai se termine lorsque le rat trouve la plateforme. Si au bout de 1 min l'animal ne trouve pas la plateforme, il y est alors guidé par l'expérimentateur. Une fois le rat sur la plateforme, il y est laissé pendant 10 secondes avant de retourner à sa cage.

Vingt-quatre heures après le dernier jour d'acquisition, un **test de rappel** est effectué. Ce test permet d'étudier la mémoire spatiale des animaux en évaluant s'ils se souviennent de la localisation de plateforme durant la phase d'acquisition. Pour cette étape, la plateforme est donc retirée de la piscine et chaque rat effectue un seul unique essai d'une durée de 1 min. Le point de départ est le même pour tous les animaux : le point SO. Le temps passé dans le quadrant-cible (où la plateforme était positionnée au cours de l'acquisition) est alors évalué.

Le dernier jour correspond au **test de plateforme indicée**, il est réalisé 24 heures après le test de rappel. Cette étape permet de vérifier les visions et la motivation des animaux. La plateforme est immergée sous la surface de l'eau mais elle est indiquée à l'aide d'une tige métallique avec à son extrémité une boule en polystyrène noir et blanc. Le rideau blanc est à nouveau placé autour de la piscine afin de masquer tous les indices allothétiques. Comme pour la phase d'acquisition, chaque rat effectue 4 essais d'une durée maximale de 1 min. L'essai se termine lorsque l'animal monte sur la plateforme. Au cours des phases d'acquisition et de plateforme indicée, le logiciel EthoVision XT (Wegeningue, Pays-Bas) est utilisé afin d'extraire les variables suivantes : la vitesse de nage, la distance et la latence pour chacun des essais.

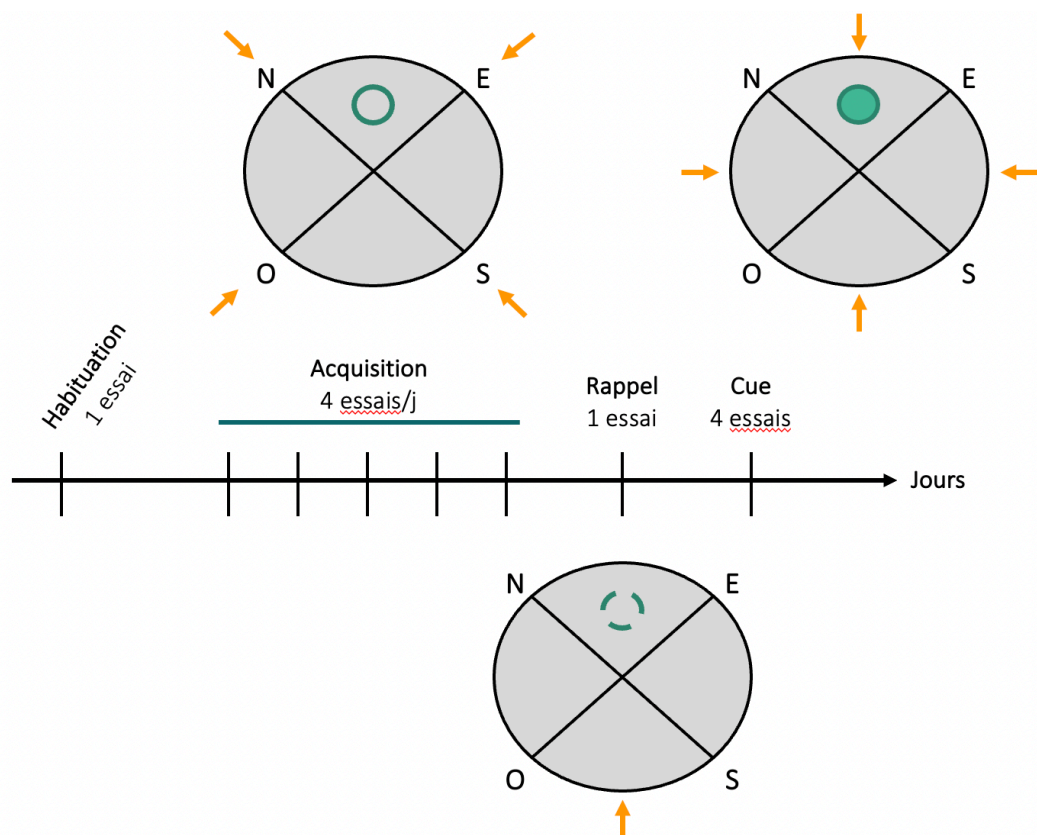


Figure 28 : Représentation schématique du protocole du test de la piscine de Morris.

Les quatre phases du test de la piscine de Morris sont représentées : l'habituation, l'acquisition, le rappel et le cue. Un schéma modélisant la piscine et les différents quadrants qui la compose est représenté pour chaque phase du test. La plateforme est représentée par le cercle en trait continu ; en pointillé pour représenter l'ancienne localisation ; en cercle plein quand elle est indiquée. La phase d'habituation est réalisée sans plateforme. Enfin, les points de lâché pour chaque phase sont représentés par les flèches orange.

V. Imagerie cérébrale

Cette partie concerne uniquement les souris de l'étude de l'EMD92 sur le modèle Dp1Yey. Au 11^{ème} jour de traitement, les animaux sont transférés (par groupe de 6) au laboratoire iCUBE pour être pris en charge par l'équipe du Dr. Laura Harsan (Imagerie multimodale intégrative en santé) et sont traités – avec la solution véhicule ou l'EMD92 – 1 heure avant leur passage en IRMf. L'analyse de l'IRMf des cerveaux de souris a été réalisée par Julien Caillette et le Dr. Laura Harsan.

1. Principe de l'IRMf

L'IRMf permet de visualiser indirectement l'activité cérébrale. Elle est basée sur l'enregistrement des variations du flux sanguin cérébral quand une zone est stimulée. La localisation de ces zones cérébrales stimulées s'appuie sur l'effet BOLD (« *Blood Oxygen Level Dependant* ») qui est associé à l'aimantation de l'hémoglobine contenue dans les globules rouges du sang.

2. Dispositif

Les IRMf cérébrales ont été effectuées avec le système d'IRM7T dédié à l'imagerie chez le petit animal (Bruker Biospec 70/30 USR). Ce système est équipé d'un gradient (BGA12SHP, Bruker) de diamètre interne de 116 mm et d'intensité maximale de 660 mT/m ainsi que du logiciel Paravision 6.1 (Bruker, Allemagne). Afin de réaliser l'acquisition du signal RMN, une antenne de réception supraconductrice de type « ^1H – Cryoprobe » et une bobine de transmission volumique de 86 mm ont été utilisées. La cryoprobe est une antenne de surface fonctionnant dans un environnement cryogénique afin d'augmenter significativement le rapport signal sur bruit. L'installation est aussi composée d'un berceau pour positionner l'animal ainsi que d'un système d'anesthésie, de chauffage et de monitoring des paramètres physiologiques (respiration, température corporelle, saturation O_2 dans le sang).

3. Anesthésie des animaux

Afin de réaliser l'acquisition des images cérébrales les animaux doivent être immobiles et donc anesthésiés. L'anesthésie utilisée est une combinaison d'isoflurane et de médétomidine (MD, Domitor, Pfizer, Karlsruhe, Allemagne) à faible concentration. Après une inhalation d'isoflurane à 3%, un bolus de médétomidine à 0.1 mg/kg a été injecté en sous cutané. La dose d'isoflurane est ensuite diminuée à 0.5% pour être à nouveau augmentée avant l'acquisition des images cérébrales anatomiques (**Figure 29A**). Cette procédure permet d'anesthésier l'animal profondément sans pour autant perturber la physiologie de la souris pendant l'acquisition (Grandjean et al. 2020).

4. Acquisition des images cérébrales

Trois types d'acquisition ont été réalisées, elles sont représentées sur la **Figure 29B** et décrites ci-dessous.

L'IRMf à l'état de repos, en anglais « *resting state fMRI* », ci-après rs-fMRI, a été effectuée à partir d'une séquence GE-EPI (écho de gradient – echo planar) pondérée en T2, avec un temps d'écho TE = 15 ms et un temps de répétition TR = 2137 ms. Ces conditions permettent d'obtenir le contraste BOLD d'IRMf. Le cerveau entier de l'animal est couvert avec 43 coupes axiales d'une épaisseur de coupe de 0,35 mm. Le champ de vue (en anglais « *Field of View* », FOV) est de 2,12 × 1,58 cm² et la taille de la matrice d'acquisition de 147 x 89. Une résolution spatiale de 0,14 × 0,18 × 0,35 mm³ est obtenue et le cerveau est scanné 500 fois au cours des 18 minutes d'acquisition. Pour chaque voxel de l'image un décours temporel (sur les 18 min) du signal BOLD à 500 points est extrait.

L'IRM anatomique est réalisée avec une séquence Turbo RARE (« *Turbo Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement* ») pondérée en T2. Les conditions suivantes sont utilisées : TE/TR = 50 ms / 5863 ms ; résolution = 0,07 x 0,07 x 0,35 mm³ ; 43 coupes, épaisseur de coupe de 0,35 mm, matrice d'acquisition de 304 × 227 et FOV de 2,12 × 1,58 cm².

L'IRM du tenseur de diffusion a été effectuée à l'aide d'une séquence DTI-EPI (TE/TR = 28,57 ms / 3000 ms ; durée des gradients de diffusion $[\delta]= 5$ ms ; séparation des gradients $[\Delta]= 11$ ms ; facteur de pondération en diffusion $b = 1000$ s/mm²). Les images cérébrales ont été obtenues en enregistrant 45 directions de diffusion non-colinéaires. La résolution est de 0.1 x 0.1 x 0.5 mm³. Le FOV sélectionné est de 2,12 x 2 cm² et la taille de la matrice d'acquisition de 213 x 196.

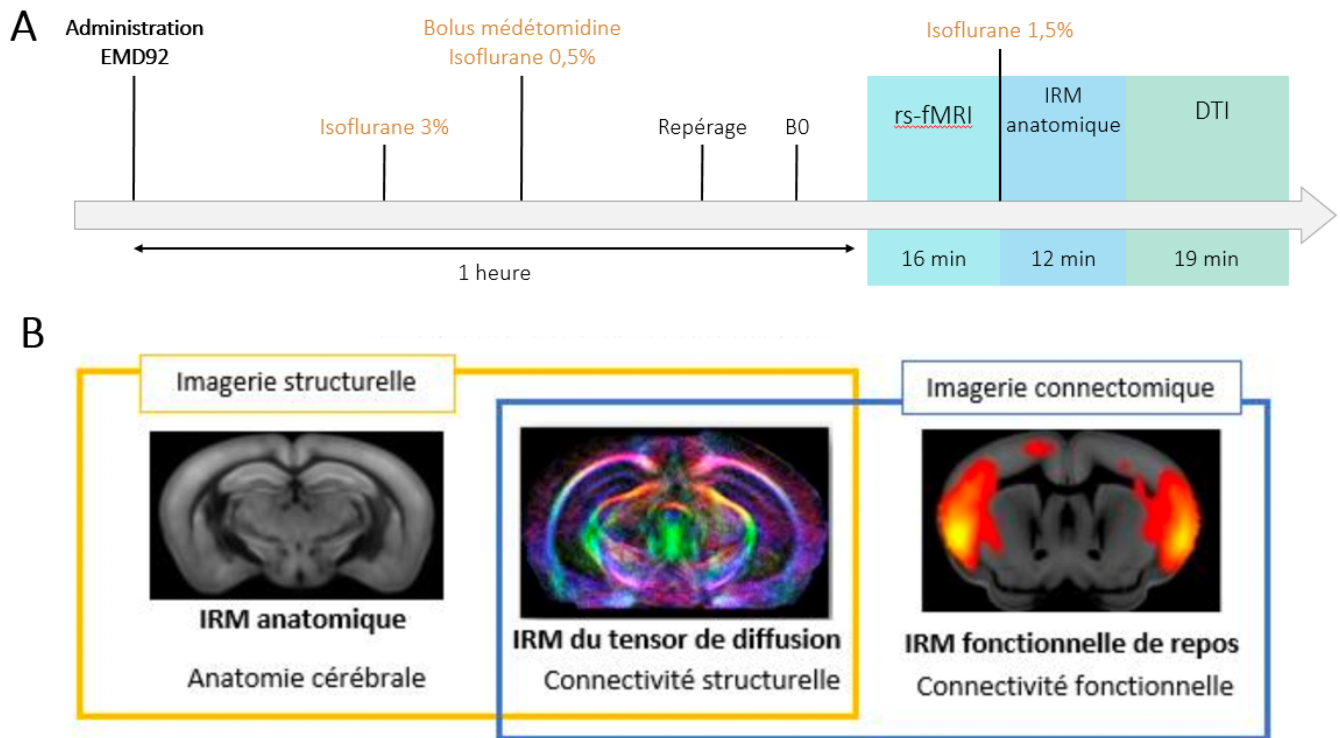


Figure 29: Plan expérimental de l'analyse d'imagerie cérébrale réalisée sur le modèle Dp1Yey traité avec l'EMD92.

(A) Représentation des différentes modalités d'imagerie cérébrale acquises. (B) Chronologie du protocole de l'étude (traitement à l'EMD92, anesthésie et acquisition des images cérébrales) pour un animal. B0 correspond à l'axe du champ magnétique et DTI à l'IRMf du tenseur de diffusion. *Modifié d'après le mémoire de projet de fin d'études de Julien Caillette.*

5. Traitement des images

Concernant la morphométrie basée sur le voxel (VBM), les images pondérées en T2 ont été corrigées pour l'intensité du signal de biais ainsi que normalisées spatialement sur l'atlas

cérébral de souris, « *Allen Brain Atlas : Mouse Brain* » avec le logiciel « *Advanced Normalization Tools* » ci-après ANTs (Tournier et al. 2019). Des cartes jacobiniennes ont été calculées pour chaque champ de déformation estimé et une transformation logarithmique a été appliquée pour la cartographie. Des comparaisons intergroupes (Dp1Yey NT vs wt NT) ont été effectuées au niveau du voxel ($p < 0.05$, « *False discovery rate correction* », FDR correction) à partir du modèle linéaire général avec le logiciel « *Statistical parametric mapping 12* », SPM12. Les résultats ont été superposés à l'image moyenne pondérée en T2 du cerveau.

Les images du tenseur de diffusion ont été prétraitées avec le logiciel MRtrix9 pour les corrections de dé-bruitage, de déballage, de mouvement et de distorsion. Les données prétraitées ont été utilisées pour générer des cartes paramétriques (« *fractional anisotropy* », FA ; « *radial diffusivity* », RD ; « *axial diffusivity* », AD ; « *mean diffusivity* », MD) qui ont été co-enregistrées à l'aide du ANTs. Des statistiques ciblant les voxels intergroupes (Dp1Yey NT vs wt NT) ont été réalisées (SPM12 ; test *t* à deux échantillons ; $p < 0.01$).

Les données rs-fMRI ont été corrigées pour tenir compte des mouvements et des distorsions à l'aide des cartes acquises en B0. Un filtre passe-haut (0.01 Hz) a été appliqué pour sélectionner les fréquences BOLD. De plus, 24 paramètres de mouvement et signaux de ventricules ont été régressés. Pour chaque sujet, l'Atlas cérébral Allen a été adapté sur les images de cerveau de façon individuelle afin d'extraire avec précision les régions d'intérêt (ROI) spécifiques au sujet (38 ROI couvrant les principales zones du cerveau). À partir de chaque ROI, le décours temporel BOLD moyen a été extrait et des matrices de corrélation ont été créées (au niveau du sujet et du groupe). La théorie des graphes a été appliquée pour cartographier les caractéristiques de la connectivité fonctionnelle pour chaque groupe.

VI. Mise à mort des animaux et prélèvements

1. Mise à mort des souris

Concernant les études réalisées sur le modèle Tg(*Dyrk1a*), chaque souris a été mise à mort au dernier jour de l'étude, 1h après leur passage dans le test du NOP. La mise à mort a été réalisée par dislocation cervicale. Pour les deux dernières études, celles effectuées sur le modèle Dp1Yey, les animaux ont été mis à mort le lendemain du test du NOP par dislocation

cervicale. La mise à mort des souris Dp1Yey de l'étude de l'EMD92, a été réalisée à l'iCUBE et s'est faite environ 2h après le traitement des animaux. Pour la dernière étude sur le modèle Dp1Yey avec l'EMD173, le sang a été prélevé au niveau de la veine faciale (sous-maxillaire) des souris. Le sang placé dans un tube hépariné de 500 µL (Sarstedt France, #2583425) est centrifugé à 5000 rpm pendant 15 min à une température de 4°C. Le surnageant, qui correspond au plasma, est recueilli dans un tube Eppendorf 1,5mL et a été congelé à -80°C. La mise à mort des animaux est réalisée immédiatement après le prélèvement sanguin, soit environ 2h après le traitement des animaux.

Pour toutes les études, des demi-cerveaux ont été prélevés afin de doser l'activité kinase de DYRK1A. L'autre hémisphère a été disséqué pour prélever les structures suivantes : l'hippocampe, le cortex préfrontal et le striatum. Une fois disséqué, les structures cérébrales sont immédiatement congelées dans l'azote liquide.

2. Mise à mort des rats

La mise à mort des cohortes de rats SD avec l'humanisation de l'APP (APP^{H2}, Dup(Rno11)-APP^{H3} et Dup(Rno11-20)-APP^{H3}) a été réalisée sur les deux derniers jours de traitement, soit le 12^{ème} et 13^{ème} jour. Les rats ont été traités avec l'EMD173 ou la solution véhicule, environ 2 heures avant leur mise à mort. Les rats ont été mis à mort par gradient progressif de dioxyde de carbone (CO₂). Après vérification de la perte complète des réflexes de retrait de la patte et du réflexe palpébral, une ponction cardiaque a été réalisée sans ouvrir la cage thoracique de l'animal. Le sang recueilli est placé dans un tube hépariné de 500 µL (Sarstedt France, 2583425) puis centrifugé à 5000 rpm à 4°C pendant 15 min. Une fois la centrifugation terminée, le plasma est placé dans un tube Eppendorf de 1,5 mL pour ensuite être congelé à -80°C.

Des demi-cerveaux ont été disséqués pour mesurer l'activité catalytique de DYRK1A dans nos différents groupes. Le second hémisphère a été disséqué pour récupérer l'hippocampe, le cortex entorhinal, le cortex préfrontal ainsi que le striatum. Le pancréas et le foie sont aussi prélevés. Les organes et les structures cérébrales ont été congelés dans l'azote liquide avant d'être placés à -80°C.

VII. Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism. La distribution normale des données est analysée avec les tests d'Agostino, Pearson et Shapiro ainsi que Wilk. Dans le cas d'une distribution normale des données, le test de l'ANOVA à deux facteurs (Génotype x Traitement) ou celui à trois facteurs (Génotype x traitement x Sexe, Jour, Zone) est utilisé. Quand les données ne suivent pas une loi normale, alors des tests paramétriques sont utilisés tel que le test de Mann-Whitney et Kruskal-Wallis. Un test « post-hoc » est réalisé lorsque la significativité des tests précédents est atteinte. Les tests « post-hoc » utilisés sont les tests de Tukey et de Šidák. Pour une moyenne à une valeur standard qui correspond au hasard le one-sample Student *t*-Test est utilisé. Pour tous les test statistiques le seuil de significativité est de $p < 0,05$.

VIII. Biologie Moléculaire

1. Extraction de protéines

Les protéines sont extraites à partir de demi-cerveaux ou uniquement d'hippocampes congelés de souris et de rats. Deux méthodes d'extraction de protéines ont été réalisées, l'une pour la réalisation de western blot et l'autre pour le dosage de l'activité de DYRK1A ainsi que l'analyse du profil du kinome.

1.1 Méthode d'extraction de protéine pour la réalisation de western blot

Les hippocampes de souris encore congelés sont placés dans des tubes contenant des billes de céramiques (Precellys® CK14 #KT03961-1-003.2) en présence de 300 µL de tampon de lyse (NaCl 0,5M ; EDTA 0,5M ; Tris 1M pH=8 ; Nonidet P40 ; SDS 5%). Le tampon de lyse est supplémenté d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases, de sodium orthovanadate et de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) (Santa Cruz, #sc-24948A). Les cocktails ajoutés au tampon de lyse sont dilués au 1/100. Les tissus sont broyés mécaniquement (Precellys 24, #EQ03119.200.RD000.0) à 6000 rpm pendant 20 secondes. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 4°C pendant 30 min à 14000 rpm. À la suite de la centrifugation, 200 µL de

surnageant sont placés dans des tubes Eppendorf de 1,5mL. Une partie du surnageant est utilisée pour le dosage protéique (5 μ L) et l'autre pour la réalisation de Western blot.

1.2 Méthode d'extraction de protéine pour le dosage de l'activité de DYRK1A

Les demi-cerveaux de souris encore congelés sont placés dans des tubes contenant des billes de céramiques (Precellys® CK14 #KT03961-1-003.2) en présence de 1,2 mL tampon de lyse. Les demi-cerveaux de rats sont découpés en deux sur glace et les quarts de cerveaux obtenus sont placés dans les tubes contenant les billes de céramiques en présence de 1 mL de tampon de lyse. La composition du tampon de lyse est la suivante : 60 mM de β -glycérophosphate, 15 mM de p-nitrophenylphosphate, 25 mM de Mops (pH 7,2), 15 mM d'EGTA, 15 mM de MgCl₂, 2 mM de dithiothreitol, 1 mM de sodium orthovanadate, 1 mM de sodium fluoride, 1 mM de phenylphosphate disodium et des inhibiteurs de protéases (Roche, #11873580001). Les tissus sont ensuite broyés mécaniquement (Precellys 24, #EQ03119.200.RD000.0) pendant 20 secondes à 6000 rpm. Après 15 min d'incubation sur glace, les échantillons sont centrifugés à 4°C pendant 30 min à 14000 rpm. À la fin de la centrifugation, le surnageant (1 mL) est récupéré pour être placé dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL. Les extraits protéiques des quarts de cerveaux de rats sont regroupés par individu à cette étape. Une partie du surnageant est utilisée pour le dosage protéique (5 μ L), une autre partie pour l'analyse du profil du kinome (50 μ L) et le reste pour la mesure d'activité kinase de DYRK1A.

2. Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été réalisé avec le kit Pierce BSA Protein Assay (Thermo Scientific - #23225) à partir de dilution des échantillons d'extraction de protéines. L'hippocampe des souris est dilué au 1/15. Les demi-cerveaux de souris et rats sont respectivement dilués au 1/15 et 1/20. Comme indiqué dans le protocole du kit, une gamme étalon a été préparée à partir d'albumine de sérum (BSA). Les concentrations de la gamme s'étendent de 0 à 1 500 μ g/mL de BSA. Toutes les dilutions, sont déposées sur une plaque de 96 puits en duplicata (20 μ L) et 200 μ L de réactif de dosage est ajouté dans chacun des puits. Après une incubation de 15 min à l'obscurité, un spectrophotomètre est utilisé pour mesurer

la densité optique à une absorbance de 570 nm. Pour chaque échantillon, la concentration en protéines, qui est proportionnelle à la densité optique, est déterminée à l'aide de la gamme étalon.

3. Western blot

Pour la réalisation des western blot, les échantillons qui ont été extraits puis dosés sont ensuite préparés par ajout de tampon de charge 5X (Pierce™ Lane Marker Reducing Sample Buffer- #39000) contenant l'agent réducteur DTT.

Pour réaliser les western blot, deux gels de polyacrylamide SDS-PAGE sont utilisés. Le premier est le gel de séparation (Acrylamide 40% ; Tris 1,5 M pH=8,8 ; SDS 10% ; APS 10% ; TEMED ; eau milliQ) avec un pourcentage en acrylamide de 10%, le second est le gel de concentration (Acrylamide 40%, Tris 0,5 M pH=6,8, SDS 10%, APS 10%, TEMED) avec un pourcentage en acrylamide de 6%. Les gels en présence d'un tampon de migration composé de Tris-Glycine-SDS (25nM Tris Base, 192 nM Glycine, 0,1% SDS) sont déposés dans des cuves d'électrophorèse. Les échantillons sont dénaturés à 95°C pendant 5 min, puis 20 µg de protéines sont déposées dans les puits. La migration est réalisée sous électrophorèse à 55 V jusqu'à sortie du front de migration du gel de concentration, puis à 90 V jusqu'à la fin de la migration.

À la fin de la migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose avec le système Trans-Blot® Turbo™ Blotting System (Bio-Rad, #170-4155). Le transfert est réalisé à 25V et 1,3A pendant 10 min selon le protocole du fournisseur.

Après le transfert, les membranes sont saturées avec du lait en poudre dilué à 5% dans un tampon de rinçage TBS 1x (10X TBS Buffer : 150mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH=7,6, supplémenté de Tween à 0,1%. La saturation est réalisée sous agitation à température ambiante pendant 1h30. Les membranes sont ensuite lavées 3 fois 10 min avec la solution de rinçage TBS-Tween 0,1%. Puis, les membranes sont incubées une nuit à 4°C ou pendant 1h30 à température ambiante avec les anticorps primaires suivants : DYRK1A (Abnova #H00001859-M01, 1 :1000), TAU-5 (Thermo Fisher #MA5-12808, 1 :100), AT8 ciblant phospho-TAU en Ser202 et Thr205 (Thermo Fisher #MN1020, 1 :1000), APP (Thermo Fisher #PA5-19923, 1 :1000), phospho-APP Thr668 (Sigma Fisher #A9103, 1 :1000). Les membranes sont lavées 3

fois 10 min avec le tampon de rinçage puis incubées 1h à température ambiante avec un anticorps secondaire : anti-lapin (Molecular probes #A16096, 1:5000) ou anti-souris (Dako #P0448, 1:5000). Les anticorps secondaires sont couplés à la peroxydase de raifort en anglais « *Horseradish Peroxidase* » (HRP). Après cette incubation, les membranes sont à nouveau lavées au TBS-Tween 0,1% 3 fois 10 min.

Les protéines sont ensuite révélées par chimioluminescence avec le SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific - #34080) ou le kit Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad, #170-5061). Les photos sont acquises avec l'imageur Amersham Imager LAS600. Une protéine de référence, ici la β -actine, est utilisée afin de normaliser le signal de la protéine d'intérêt. Pour cela, la membrane est incubée pendant 15 min à température ambiante dans une solution de Restore™ Plus Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific - #46430). Cette solution permet un « stripping », c'est-à-dire le décrochage des anticorps. La membrane est ensuite rincée 3 fois 15 min avec le tampon de rinçage et une nouvelle étape de saturation est réalisée avec du lait à 5% comme décrit ci-dessus. L'anticorps primaire de la β -actine (Sigma, #A38-54) couplé à la HRP est incubé 1h30 à température ambiante avec la membrane. Après révélation du signal, la densité de ce dernier est quantifiée avec le logiciel ImageJ.

4. Dosage de l'activité catalytique de DYRK1A par HPLC

Les extraits protéiques des demi-cerveaux de souris et de rats ont été confiés au Dr. Julien Dairou du Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques de l'Université Paris Descartes, pour réaliser le dosage de l'activité kinase de DYRK1A. La méthode utilisée par le Dr. Julien Dairou est basée sur la séparation et la quantification par chromatographie liquide ultra rapide en phase inverse (HPLC, en anglais « *High performance liquid chromatography* ») d'un substrat peptidique marqué à la fluorescéine de DYRK1A et de son produit phosphorylé (Bui et al. 2014).

4.1 Principe de l'HPLC

La méthode HPLC consiste à séparer les constituants d'un mélange. Le principe est basé sur un fluide dit phase mobile, qui parcourt une colonne remplie de phase stationnaire. Le

mélange à séparer est injecté à l'entrée de la colonne. Les analytes qui constituent le mélange vont être plus ou moins retenus par la phase stationnaire en fonction de leurs propriétés physicochimiques. Ainsi, les analytes retenus suivant leur propriété physico-chimique par la colonne, sont élués les uns après les autres par l'écoulement de la phase mobile. À la sortie de la colonne, un détecteur génère un chromatogramme, c'est-à-dire l'enregistrement du signal au cours du temps d'éluion. Ce dernier est un enregistrement du passage de chaque analyte dans le détecteur qui est caractérisé par le temps au bout duquel un composé est élué de la colonne et détecté, c'est le temps de rétention. Dans le chromatogramme, l'amplitude des pics et le signal basal (correspondant à la phase mobile seule) permettent ensuite de mesurer la concentration de chaque analyte présent dans le mélange initialement injecté.

4.2 Le FAM-peptide

Le substrat peptidique a pour séquence 5FAM- KKISGRLSPIMTEQ-NH₂. Cette séquence est issue de la protéine forkhead transcription factor qui est une cible physiologique de DYRK1A. Un chromophore, la fluorescéine-5-FAM, est greffé sur la partie C-terminale du peptide. Le FAM-peptide a été synthétisé par Genosphere (Paris, France) avec un degré de pureté supérieur à 95% en HPLC.

4.3 Protocole de dosage

Les dosages de l'activité de DYRK1A sont effectués dans des plaques ELISA de 96 puits. Un volume de 50 µL de tampon kinase (50 mM Tris-HCl, 10 mM DTT et 5 mM MgCl₂) est déposé dans les puits, supplémenté d'ATP (1000 µM), de FAM-peptide (jusqu'à 30 µM) et d'extraits protéiques à doser, 100 µg de protéines. Le volume final de la réaction est de 100 µL. Les échantillons contenant l'enzyme sont pré-incubés avec un substrat peptidique à 37°C pendant 10 min. La réaction enzymatique débute (t₀) lorsque l'enzyme et les deux substrats (ATP et peptide) sont ajoutés et elle s'arrête par l'ajout de 100 µL d'une solution de perchlorate à 15%. Après centrifugation de la plaque ELISA, le surnageant est récupéré et injecté dans la colonne de HPLC.

Pour la réalisation de l'HPLC, les échantillons sont injectés dans une colonne Ascentis Express C8 (longueur = 150 mm, diamètre intérieur = 4,6 mm, taille des particules = 2,7 µm) à

40 °C. La phase mobile de la colonne pour la séparation, se compose de deux éluants : le solvant A composé d'eau et de 0,12% d'acide trifluoroacétique (TFA) ainsi que le solvant B qui est l'acétonitrile avec 0,12% de TFA. Les composés sont séparés par un débit isocratique de 1,5 ml/min avec 85% de solvant A et 15% de B. L'émission de fluorescence ($\lambda = 530$ nm) après excitation à $\lambda = 485$ nm permet de révéler le chromophore greffé sur le peptide cible de DYRK1A.

L'aire des pics du chromatogramme obtenue est proportionnelle à la quantité du produit quantifié. Une courbe d'étalonnage est réalisée par injection de solutions à diverses concentrations connues de peptides, cette courbe permet de convertir l'aire d'un pic et une concentration de peptide.

5. Analyse du profil d'activité du kinome

L'analyse du profil du kinome a été réalisée à partir de l'extraction de protéine décrite dans la partie VII., 1.2. Méthode d'extraction de protéine pour le dosage de l'activité de DYRK1A. Les échantillons sont ensuite dosés comme indiqué en VII. 2. Dosage des protéines. Un volume de 50 μ L des extraits est alors confié à Valérie Calco de la Plateforme de Chimie Biologique Intégrative de Strasbourg (Illkirch, France) pour la partie expérimentale. Les résultats obtenus sont analysés et interprétés par le Dr. Savithri Rangarajan de chez PamGene International BV ('s-Hertogenbosch, Pays-Bas).

Le profil d'activité du kinome a été réalisé à l'aide de matrices « Serine Threonine Kinase PamChip® Array » (PamGene, #32501) pour la Pamstation®12 (PamGene, #31500). Ce système permet la mesure de l'activité des kinases dans les échantillons en évaluant la phosphorylation des peptides des substrats immobilisés dans les matrices. Les matrices se composent de 144 substrats peptidiques, principalement avec des résidus de sérine et thréonine connus. Trois puces sont utilisées simultanément et chaque puce se compose de quatre matrices. Pour chaque échantillon, 1 μ g de protéines est déposée dans une puce. La position des échantillons (génotype et traitement) dans les matrices est randomisée pour éviter tout biais. Une fois déposés, l'analyse de l'activité du kinome est réalisée en suivant le protocole du fournisseur. Voici en quelques lignes le protocole expérimental : les lysats sont pompés à plusieurs reprises de haut en bas à travers le réseau poreux, permettant une phosphorylation répétée des

substrats en présence d'ATP. Pour visualiser la phosphorylation, des anticorps marqués par fluorescence et ciblant les sites de phosphorylation sont utilisés.

Une fois les résultats obtenus, la qualité de l'ensemble des données est vérifiée afin de vérifier leur fiabilité. L'identification des substrats dont la phosphorylation est statistiquement différente entre les différents groupes (génotype, traitement) est alors réalisée. Le signal de la phosphorylation d'un substrat est le résultat de l'activité d'une ou de plusieurs kinases de l'extrait protéique. Afin de déterminer quelles kinases sont responsables des différences de phosphorylation entre les groupes, une analyse de kinase en amont (UKA, en anglais « *Upstream Kinase Analysis* ») est réalisée. L'UKA est un algorithme qui permet d'identifier les ensembles de substrats phosphorylés liés à une kinase à l'aide des bases de données de relations kinase-substrat accessibles au public. À partir de cette analyse, des arbres du profil d'activité du kinome sont générés.

Projet III : Identification de potentiels nouveaux interacteurs de DYRK1A : optimisation d'une méthode d'analyse d'interaction protéine-protéine.

I. Animaux

1. Le modèle *Dyrk1a*-OST

La lignée de souris *Dyrk1a*-One-Strep-TAG, ci-après *Dyrk1a*-OST, a été générée au sein de notre établissement utilisateur, l'ICS. Pour la création de ce modèle, un « *knock-in* » a été réalisé afin d'introduire la séquence du TAG dans un locus ciblé du gène *Dyrk1a*. Ce « *knock-in* » est créé avec le système de recombinaison Cre-*LoxP*. Un vecteur cible contenant la séquence du TAG en C-terminal de l'exon 2 du gène *Dyrk1a* a été utilisé pour remplacer la séquence de l'allèle wt (**Figure 30**). Le vecteur a été transfecté dans des cellules souches embryonnaires dérivées de souris au fond génétique C57BL/6N. Après recombinaison, les cellules portant le « *knock-in* » sont identifiées grâce à la cassette de sélection codant pour une protéine de résistance à la néomycine. Ces cellules sont injectées dans des blastocytes de souris qui sont ensuite implantés dans des mères nourricières. Ces dernières ont donné naissance à des souris chimériques portant l'allèle recombinant qui sont capables de transmettre efficacement le « *knock-in* » à leur progéniture. Le TAG inséré aussi noté One-Strep-Tag, code pour le peptide Strep-tag II composé de huit acides aminés neutres : Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys. La protéine de fusion formée permet la réalisation d'une chromatographie d'affinité sur colonne grâce au peptide Strep-tag II comme expliqué à la page 140 dans la partie III. 2. Chromatographie d'affinité sur colonne.

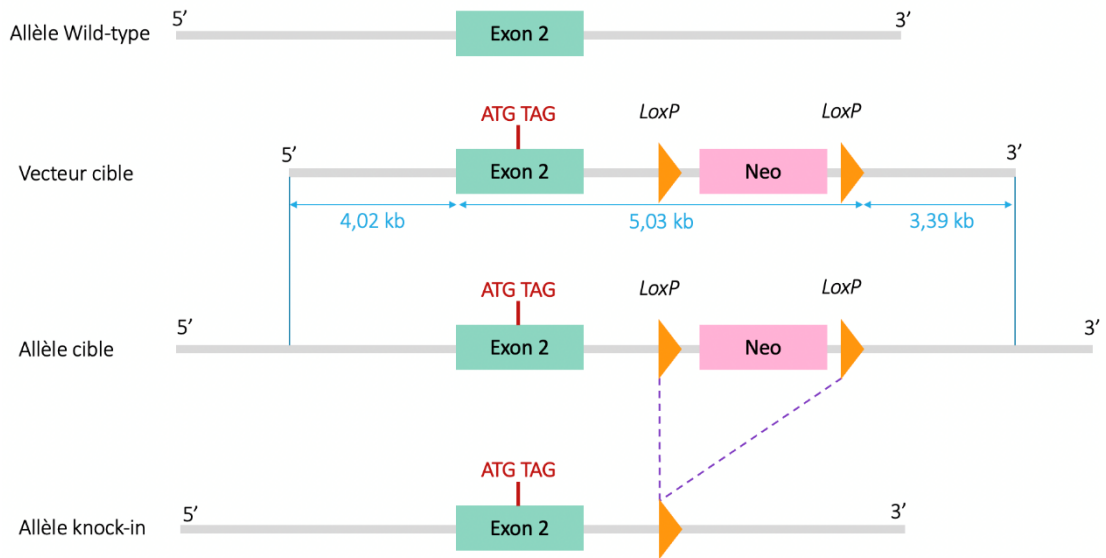


Figure 30 : Construction du modèle *Dyrk1a*-OST avec le système d'ingénierie Cre-loxP

Le premier allèle de la figure représente l'allèle wt avec l'exon 2 du gène *Dyrk1a*. Le vecteur cible utilisé pour la construction du modèle *Dyrk1a*-OST, est représenté avec le TAG (en rouge) au niveau de l'exon 2, les sites *LoxP* (en orange) de part et d'autre de la cassette de sélection (noté Neo, en rose) codant pour la protéine de résistance à la néomycine. Les sites *LoxP* permettent la délétion de la cassette de sélection par la Cre recombinase (représenté par des pointillés violets) lors de la formation de l'allèle « *knock-in* ».

2. Hébergement des animaux

Dans l'animalerie, les souris sont placées dans des cages étanches et individuellement ventilées (Sealsafe® Plus #GM500, Tecniplast, France) grâce aux portoirs sur lesquelles elles sont placées. Les animaux sont hébergés par groupe de 5 pour les femelles et par groupe de 4 pour les mâles au maximum. Les souris ont un accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture. Les pièces de stabulation sont soumises à un cycle lumière/obscurité de 12h avec l'éclairage en lumière artificielle débutant à 7h du matin. La température des salles d'hébergements est contrôlée ($23 \pm 1^\circ\text{C}$). Ces animaux n'ont jamais été transférés en zone de phénotypage, aucun test comportemental n'ayant été réalisé.

Toutes les expériences réalisées sur les animaux au cours de ce projet respectent les directives nationales (décret n°2013-118 du 1^{er} février 2013) du Ministère de l'Agriculture et

de la Forêt, Service vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale ainsi que les directives européennes (directives 2010/63/UE) relatives à la protection des animaux utilisés dans la recherche.

II. Génotypage de la lignée *Dyrk1a*-OST

1. Digestion tissulaire pour l'extraction d'ADN

Comme pour le Projet II, une biopsie de queue de souris est prélevée pour le génotypage des animaux, dans les dix jours suivant la naissance des animaux. Pour le génotypage de la lignée de souris *Dyrk1a*-OST, la digestion tissulaire des biopsies a été réalisée avec du NaOH. Comme détaillé dans le Projet II. 1.1.1. Digestion tissulaire avec l'hydroxyde de sodium, les biopsies de souris sont digérées dans 200 μ L de solution de NaOH à 50 mM et incubées pendant 30 min à 98°C. Une fois la digestion terminée, 25 μ L de Tris-HCl pH=8 sont supplémentés aux échantillons. Ces derniers sont ensuite centrifugés à 14000 rpm pendant 10 min et le surnageant est utilisé pour la réaction de PCR.

2. Amplification par la technique de PCR

Pour les réactions de PCR, 1 μ L d'ADN dilué au 1/10^{ème} est ajouté à 14 μ L d'un mix dont la composition est détaillée dans la **Table 18**. Les amorces utilisées pour l'amplification de l'ADN et permettant de différencier l'allèle contenant le TAG et l'allèle wt de la lignée *Dyrk1a*-OST sont les suivantes : Sr (5'- GAT GTC CTC GGG GTA CTT GGT G -3') et Xf (5'- GGA CTC TTC CCT CCC TTC CC -3'). La réaction de PCR est réalisée dans un thermocycleur selon les conditions de dénaturation, d'hybridation et d'élongation comme décrites dans la **Table 19**.

	Concentration finale	Volume final
Tampon de réaction + MgCl ₂	1x	1,5µL
dNTP	10µM	0,3µL
Amorces	10µM	0,5µL
Taq polymérase (Roche)	5U/µL	0,2µL
ADN	~ 100ng	1 µL
H ₂ O	/	11,5 µL

Table 18 : Composition du mix pour l'amplification d'ADN lors de la PCR de la lignée *Dyrk1a*-OST.

La composition décrite correspond à la préparation du mix pour un seul échantillon.

Température	Temps	Nombre de cycles
94°C	3 min	1
94°C	20 s	40
60°C	20 s	
68°C	1 min	
68°C	7 min	1

Table 19 : Conditions de la PCR de la lignée souris *Dyrk1a*-OST

3. Migration par électrophorèse sur gel d'agarose

La séparation des produits de PCR obtenus est réalisée en fonction de leur taille par électrophorèse sur un gel d'agarose de 2% contenant du bromure d'éthidium (BET, 1 µL pour 80 mL d'agarose, Euromedex #EU0070). Les échantillons sont déposés sur le gel après ajout de

4 μ L de tampon de charge (Thermo Scientific™ #R1161) et migrent pendant 30 min à 130V. Le gel est ensuite révélé sous ultra-violets. Au cours de la révélation du gel, une bande de 132 pb est obtenue pour les animaux wt. Les souris homozygotes pour le TAG sur le gène *Dyrk1a* ont une bande à 211 pb. Par conséquent, les souris hétérozygotes présenteront les deux bandes : 132 et 211 pb.

III. Biologie moléculaire

Pour les analyses de biologie moléculaire, des souris wt et *Dyrk1a*-OST homozygotes (ci-après *Dyrk1a*^{ost/ost}) ont été utilisées. Les souris sont mises à mort par dislocation cervicale. Les demi-cerveaux sont récupérés et congelés dans l'azote liquide puis placés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

1. Extraction de protéines

Les demi-cerveaux de souris wt et souris *Dyrk1a*^{ost/ost} encore congelés sont placés dans des tubes contenant des billes de céramiques (Precellys® CK14 KT03961-1-003.2) en présence de 1.2 mL de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl pH=7,4, 7,5% Glycérol, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) supplémenté d'inhibiteurs de protéases (Roche, #1873580). Les tissus sont broyés mécaniquement (Precellys 24, #EQ03119.200.RD000.0) à 6000 rpm durant 20 secondes. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 4°C pendant 30 min à 50000 rpm et 1 mL de surnageant est transféré dans un tube en polypropylène de 1,5 mL (Berckmann, #343169). Les échantillons sont ensuite ultra-centrifugés à 50000 rpm durant 30 min. Après l'ultracentrifugation, le surnageant est transféré dans un tube Eppendorf de 1.5 mL. Une partie du surnageant est utilisée pour le dosage protéique (5 μ L), une autre partie (50 μ L) est congelée à -80°C pour la réalisation de western blot et le reste est utilisé pour la chromatographie d'affinité sur colonne.

2. Chromatographie d'affinité sur colonne

2.1 Principe

La chromatographie d'affinité sur colonne permet de séparer les molécules d'un mélange en se basant sur les propriétés d'interactions biologiques. Un ligand spécifique de la protéine à purifier est fixé sur une matrice insoluble. Dans notre protocole, la technologie utilisée est le système Strep-Tag (**Figure 31**). Le ligand correspond à la Strep-Tactin (biologiquement inerte) qui est une streptavidine synthétique présentant une affinité de liaison au Strep-Tag II, cent fois plus importante que la streptavidine. Ce système permet la purification de complexe protéique et d'interaction protéine-protéine. Le lysat protéique contenant la protéine de fusion, ici DYRK1A-OST (aussi noté DYRK1A-Strep-tag II), est déposé sur une colonne avec la Strep-Tactin immobilisée sur la résine. Les protéines de l'extrait non retenues par la colonne sont éluées pendant les étapes de lavages. Les complexes protéiques contenant DYRK1A sont élués au cours des étapes d'élutions. En effet, le tampon d'élution contient de la desthiobiotine (vitamine H) qui va entrer en compétition pour la poche de liaison de la biotine et les complexes protéiques liés à la Strep-Tactin vont se décrocher.

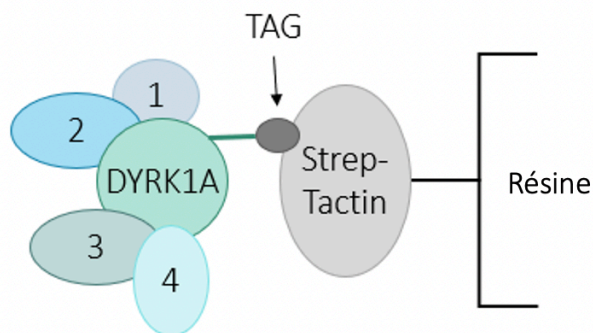


Figure 31 : Principe du système de chromatographie d'affinité Strep-Tag.

2.2 Protocole

Les colonnes de chromatographie d'affinité et les tampons utilisés au cours de ce projet proviennent du fournisseur © IBA Lifesciences GmbH, Göttingen, Allemagne. Pour une même expérience, deux colonnes de chromatographie (Gravity flow, Strep-TActin SuperFlow Column, IBA #2-1207-001) ont été utilisées : l'une correspondra au contrôle, dépôt de l'homogénat

protéique de souris wt ; et l'autre à la colonne DYRK1A-OST, dépôt de l'homogénat protéique des souris *Dyrk1a^{Ost-ost}*. La matrice des colonnes utilisée ne doit jamais sécher et doit donc toujours être en présence d'un tampon et les colonnes sont placées en suspension dans des tubes Falcon de 15 mL afin de récupérer les différentes fractions de lavage et d'élution à la sortie de la colonne. Toutes les étapes suivantes ont été réalisées en chambre froide à 4°C. Tout d'abord, le bouchon localisé à la sortie de la colonne de Strep-Tactin est retiré pour enlever le tampon de stockage de la colonne. La colonne est équilibrée 2 fois avec 1 mL du tampon de lavage composé de 100 mM de Tris-HCl pH=8, 150 mM de NaCl et 1 mM d'EDTA. La totalité de l'homogénat protéique est appliquée à la colonne. Une fois que tout l'homogénat est dans la colonne et que la majorité a traversé la colonne, l'étape de lavage de la colonne débute. La colonne est lavée avec cinq fois avec 1 mL de tampon de lavage. Chaque fraction de lavage récupérée dans un tube Falcon de 15 mL, est transférée dans un tube Eppendorf de 1,5mL pour ensuite être congelé à -80°C. Une fois les lavages terminés, l'étape d'élution du complexe protéique débute. Pour cela, le tampon d'élution (100 mM Tris-HCl pH=8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM desthiobiotin) est appliqué dans la colonne à raison de six fois 500 µL. Chacune des fractions d'élutions sont récupérées dans des tubes Falcon de 15mL différents. À la fin de chaque élution, la fraction est transférée dans un tube Eppendorf de 1,5mL pour ensuite être congelé à -80°C.

3. Dosage de protéines

Le dosage de protéines a été réalisé avec le kit Pierce BSA Protein Assay (Thermo Scientific - #23225) à partir d'une dilution au 1/15 de l'homogénat protéique et 1/10 des fractions de lavages. Comme indiqué par le fournisseur du kit, une gamme étalon de BSA a été utilisée. Les échantillons sont déposés (20 µL) sur une plaque de 96 puits en duplicata et supplémentés de 200 µL de réactif de dosage. Après une incubation de 15 min à l'obscurité, la densité optique est mesurée à 570 nm. Pour chaque échantillon la concentration en protéines est déterminée à l'aide de la gamme étalon.

4. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE a été effectuée sur les échantillons de protéines provenant des différentes étapes de la chromatographie d'affinité sur colonne (fractions de lavages et d'élutions), de l'extraction de protéine (avant et après l'ultracentrifugation) ainsi que le premier écoulement de la colonne après y avoir appliqué l'homogénéat. La migration des protéines sur gel de polyacrylamide est une procédure effectuée avant la coloration d'argent des protéines et avant le western blot.

Les extraits protéiques et les différentes fractions de lavages et d'élution sont préparés par ajout de tampon de charge 5X (Pierce™ Lane Marker Reducing Sample Buffer- #39000) contenant l'agent réducteur DTT. Deux gels de polyacrylamide SDS-PAGE sont utilisés. Le premier est le gel de séparation (Acrylamide 40% ; Tris 1,5M pH=8,8 ; SDS 10% ; APS 10% ; TEMED ; eau milliQ) avec un pourcentage en acrylamide dépendant de la protéine ciblée pour les western blot et un pourcentage de 10% en acrylamide pour la coloration d'argent des protéines. Le second est le gel de concentration (Acrylamide 40%, Tris 0,5M pH=6,8, SDS 10%, APS 10%, TEMED) avec un pourcentage en acrylamide de 6%. Les gels en présence d'un tampon de migration composé de Tris-Glycine-SDS (25nM Tris Base, 192 nM Glycine, 0,1% SDS) sont déposés dans des cuves d'électrophorèse. Les échantillons sont dénaturés à 95°C pendant 5 min. Puis 20 µg de protéines des échantillons d'extraction de protéines et la première fraction de lavage sont déposés dans les puits. La faible concentration en protéines des fractions d'élutions ne permettant pas le dosage, 20 µL de ces fractions ont été déposés sur les puits comme suggéré par le fournisseur des colonnes de chromatographie. La migration est réalisée sous électrophorèse à 55 V jusqu'à sortie du front de migration du gel de concentration, puis est augmentée 90 V jusqu'à la fin de la migration.

5. Coloration d'argent des protéines sur gel SDS-PAGE

Pour la réalisation de coloration d'argent des protéines, le gel de polyacrylamide est déposé dans une cuve en plastique placée sur un agitateur à température ambiante. Les solutions utilisées proviennent du kit de coloration d'argent ProteoSilver™ (Sigma, # PROTSIL1-1KT) et sont toutes préparées avec de l'eau ultrapure comme décrit par le fournisseur.

La coloration débute par une étape de fixation, 100 mL de la solution de fixation sont ajoutés dans la cuve pendant 20 min. Le gel est ensuite lavé avec une solution d'éthanol à 30% pendant 10 min, puis avec 200 mL d'eau ultrapure pendant 10 min. Après avoir retiré l'eau, le gel est mis en présence de 100 mL de la solution sensibilisante pendant 10 min. Après avoir retiré la solution sensibilisante, le gel est lavé avec 200 mL d'eau ultrapure pendant 10 min puis incubée avec 100 mL de solution d'équilibration d'argent pendant 10 min. Un lavage très rapide de 1 à 1,5 min maximum est réalisé avec de l'eau ultrapure. Une fois l'eau retirée, la coloration d'argent du gel est révélée avec 100 mL de solution « développeur » pendant 10 à 12 min. La réaction de coloration est arrêtée avec 5 mL de solution « ProteoSilver Stop » supplémentée directement dans la solution de révélation et incubée pendant 5 min. Un dernier lavage avec 200 mL d'eau ultrapure est effectué pendant 15 min.

6. Western Blot

Après le transfert, les membranes sont saturées avec du lait en poudre dilué à 5% dans un tampon de rinçage TBS 1x supplémenté de Tween à 0,1%. La saturation est réalisée sous agitation à température ambiante pendant 1h30. Les membranes sont ensuite lavées 3 fois 10 min avec la solution de rinçage TBS-Tween 0,1%. Puis, les membranes sont incubées soit à 4°C pendant toute une nuit, soit à température ambiante pendant 1h30 avec l'anticorps primaire suivant : DYRK1A (Abnova #H00001859-M01, 1 :1000). Les membranes sont lavées 3 fois 10 min avec le tampon de rinçage puis incubées 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti-souris (DAKO #P0448, 1:5000). L'anticorps secondaire est couplé à la HRP. Après cette incubation, les membranes sont à nouveau lavées au TBS-Tween 0,1% 3 fois 10 min. Les protéines sont relevées par chimiluminescence avec le SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific - #34080) ou le kit Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad, #170-5061). Les photos sont acquises avec l'imageur Amersham Imager LAS600 et la densité du signal obtenu est quantifiée avec le logiciel ImageJ.

7. Spectrométrie de masse

Les fractions d'élutions E2 et E3 de la colonne *Dyrk1a*-OST et de la colonne contrôle ont été confiées à plateforme de protéomique de l'IGBMC (Illkirch, France) dirigé par le Dr. Luc Negroni pour l'identification des protéines par spectrométrie de masse.

Résultats

Projet I : Validation et caractérisation d'un nouveau modèle trisomique pour le gène *Dyrk1a*

L'objectif de ce premier projet a été de valider et caractériser un nouveau modèle rat présentant trois copies du gène *Dyrk1a* afin de mieux comprendre les mécanismes perturbés par la trisomie du gène *Dyrk1a* chez le rat. Ce projet a permis de comparer les déficits mnésiques ainsi que les altérations moléculaires de ce modèle par rapport à des modèles souris trisomiques pour le gène *Dyrk1a*, mais aussi de valider des candidats médicamenteux sur une autre espèce.

Un premier modèle a été généré avec la technologie CRISMERE dérivé du système CRISPR/Cas9 : le modèle Dup1(*Dyrk1a*) (Birling et al. 2017). Ce modèle présente une duplication d'un fragment de 121.7 kb du gène *Dyrk1a*. Afin de caractériser les phénotypes de ce modèle, une batterie de tests comportementaux a été réalisée. Les analyses n'ont révélé aucun déficit d'apprentissage et de mémoire chez les rats Dup1(*Dyrk1a*). Les cerveaux des rats ont ensuite été prélevés et le niveau d'expression de la protéine DYRK1A a été quantifié par western blot afin de valider la surexpression de DYRK1A. Les analyses de western blot n'ont révélées aucune surexpression de DYRK1A chez les rats Dup1(*Dyrk1a*). De plus, la quantification du nombre de copie de gène par ddPCR ayant validée la présence de trois copies du gène *Dyrk1a*, il est possible que des séquences régulatrices soient en amont du gène *Dyrk1a* et que la duplication d'un fragment de 121.7 kb ne soit pas suffisante pour englober ses séquences. Par conséquence, un second modèle a été généré, le modèle Dup2(*Dyrk1a*). Ce modèle présente aussi une trisomie du gène *Dyrk1a*, mais avec une duplication comprenant une plus grande région non-codante (219 kb) dans le but d'inclure les séquences régulatrices. J'ai validé la construction de ce modèle en quantifiant le niveau d'ARNm de *Dyrk1a* ainsi que le niveau d'expression de la protéine. De plus, la région dupliquée dans le modèle Dup2(*Dyrk1a*) étant plus grande que dans le modèle Dup1(*Dyrk1a*), le niveau d'ARNm des deux gènes se trouvant de part et d'autre de *Dyrk1a* (*Kcnj6* et *Dscr3*) ont été analysés pour vérifier que la duplication du gène *Dyrk1a* n'impact pas ces gènes. J'ai également réalisé une analyse phénotypique de ce modèle avec une batterie de tests comportementaux afin d'évaluer l'anxiété, l'activité locomotrice, la mémoire de travail, la mémoire spatiale à court terme, la mémoire de reconnaissance ainsi que l'apprentissage et la mémoire spatiale à long terme. Par ailleurs, la

surexpression du gène *Dyrk1a* étant impliquée dans l'apparition des dysmorphies crâniofaciales du SD, le Dr. José Thomas Ahumada Saavedra – membre de l'équipe du Dr. Yann Hérault – a débuté une analyse crâniofaciale dans le but de vérifier si un phénotype comme une brachycéphalie est observé chez les rats Dup2(*Dyrk1a*) (McElyea et al. 2016; Rodrigues et al. 2019). Pour éclaircir les mécanismes moléculaires sous-jacents aux défauts cognitifs des rats Dup2(*Dyrk1a*), des études du profil d'activité du kinome ainsi que du transcriptome sont en cours. Les résultats de cette étude sont présentés sous forme d'une publication scientifique qui n'est pas achevée du fait de l'attente des derniers résultats de l'étude crânio-faciale et de l'analyse du profil d'activité du kinome ainsi que du transcriptome. Enfin, un dosage d'activité kinase de DYRK1A réalisé sur des extraits protéiques de demi-cerveaux de rats Dup2(*Dyrk1a*) permettra de finaliser la validation de ce nouveau modèle de trisomie de *Dyrk1a*.

Afin de compléter cette publication centrée sur la perturbation du dosage de *Dyrk1a* chez le rat, la validation et la caractérisation d'un modèle de rat présentant une seule copie pour le gène *Dyrk1a* : le modèle Del(*Dyrk1a*) ont été ajoutées. Sachant que l'haploinsuffisance de *Dyrk1a* conduit au MRD7, ce modèle a été généré dans le but d'étudier les mécanismes biologiques altérés dans le cas d'une monosomie de *Dyrk1a* chez le rat adulte (Courcet et al. 2012; Møller et al. 2008; Arbones et al. 2019). Après une quantification du niveau de DYRK1A chez les rats Del(*Dyrk1a*), une analyse comportementale similaire à celle réalisée chez les rats surexprimant *Dyrk1a* a été effectuée. Sachant que les personnes atteintes du MRD7 présentent un trouble du spectre de l'autisme, les capacités sociales des rats Del(*Dyrk1a*) ont également été mesurées. La caractérisation de ce modèle a été complétée par une analyse crânio-faciale, une étude du profil du kinome ainsi que du transcriptome. L'étude de ce modèle a été réalisée par le Dr. Damien Maréchal.

New rat models with duplication and deletion of *Dyrk1a* for assessment of Down and MRD7 syndromes.

Helin Atas-Özcan¹, Damien Maréchal², José Thomas Ahumada Saavedra¹, Maria del Mar Muniz Moreno³, Julien Dairou⁴, Marie-Christine Birling⁵, Véronique Brault¹, Yann Héroult^{1,5}

¹Institut de Génétique Biologie Moléculaire et Cellulaire, Translational Medicine and Neurogenetics program, IGBMC, CNRS, INSERM, Université de Strasbourg, UMR7104, UMR964, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France.

²Neuroscience Initiative, Advanced Science Research Center, CUNY, New York City, New York, USA.

³John P. Hussman Institute for Human Genomics, Leonard M. Miller School of Medicine, University of Miami, Miami, FL 33136 USA; The Dr. John T. Macdonald Foundation Department of Human Genetics, Leonard M. Miller School of Medicine, University of Miami, Miami, FL 33136, USA.

⁴UMR 8601 CNRS, Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, Université Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité, 75270, Paris, France.

⁵PHENOMIN, Institut Clinique de la Souris (ICS), CNRS, INSERM, University of Strasbourg, 1 rue Laurent Fries, F-67404 Illkirch-Graffenstaden, France.

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France.

***Corresponding author:** Yann Héroult

Institut de Génétique Biologie Moléculaire et Cellulaire, Translational medicine and Neuroscience program, IGBMC, CNRS, INSERM, Université de Strasbourg, UMR7104, U964, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France.

Tel: +33 388655657

Fax: +33 238 25 5450

Email: herault@igbmc.fr

Keywords: Mental Retardation autosomal Dominant 7, Down syndrome, DYRK1A, mental retardation, rat model.

Introduction

The Dual-specificity tyrosine-regulated kinases 1A (DYRK1A) is one member of the mammalian DYRK subfamily belonging to the CMCG kinase group which are highly conserved among organisms. DYRK1A kinase like other DYRK family members catalyzes its autophosphorylation – on tyrosine residue localized in the kinase domain (Tyr321) – and the phosphorylation of serine/threonine residues on exogenous substrates (W. Becker et Sippl 2011; Himpel et al. 2001; Soundararajan et al. 2013). Many proteins involved in various signaling pathways are interacting or phosphorylated by DYRK1A (Duchon et Herault 2016; Atas-Ozcan et al. 2021). As such, DYRK1A has been shown to be involved in many biological processes such as the cell cycle, differentiation and arborization of neuronal cells, vesicle trafficking and neurotransmission (Dang et al. 2018; Grau et al. 2014; Hämmerle et al. 2011; Ori-McKenney et al. 2016; Park et al. 2012; Soppa et al. 2014).

The importance of DYRK1A dosage has been first demonstrated in *Drosophila melanogaster* by studying the homologous *minibrain* gene (*mnb*). Indeed, the mutation of *mnb* leads to a decrease in the production of neuroblastic cells resulting in the volume increases of the adult optic lobes and central brain hemispheres (Tejedor et al. 1995). The essential role of DYRK1A which is further demonstrated by the generation of a knock-out mouse model for *Dyrk1a*, *Dyrk1a*^{+/-} animals presents a 30% decrease in brain size compared to control mice as well as cognitive deficits in recognition memory and spatial learning memory, and hypoactivity (Vassiliki Fotaki et al. 2002; V. Fotaki et al. 2004; Arqué et al. 2008). While *Dyrk1a*^{+/-} mice show a reduction in viability, homozygous *Dyrk1a*^{-/-} mice die during organogenesis (Vassiliki Fotaki et al. 2002). In humans, haploinsufficiency of DYRK1A was found associated with "Mental Retardation autosomal Dominant 7" syndrome, hereafter MRD7 (Møller et al. 2008; Courraud et al. 2021). This syndrome is characterized by microcephaly, mental retardation, impaired language development, epilepsy, anxiety behavior problems, and autism spectrum disorder (Bronicki et al. 2015; Earl et al. 2017; Ji et al. 2015; Luco et al. 2016; Courraud et al. 2021). Phenotypes observed by DYRK1A haploinsufficiency in MRD7 highlight the crucial role of DYRK1A in a dose-dependent manner in neurocognitive development.

In human, the *DYRK1A* gene is located on the long arm of chromosome 21 (Hsa21) at 21q22.13 and extends over about 150 kb. The overdosage of DYRK1A was linked to some of the

phenotypes observed in Down syndrome (DS), like cognitive impairments, due to the trisomy of Hsa21 (X. Altafaj 2001; Ahn et al. 2006; Souchet et al. 2014). In mouse, the *Dyrk1a* gene maps to chromosome 16, in the syntenic region to the Hsa21 (W.-J. Song, Chung, et Kurnit 1997). The Dp(16)1Yey mouse model which presents a trisomy of the Mmu16 syntenic region to Hsa21, has a delay in learning abilities, a deficit in spatial memory, an alteration of memory associated with context, an alteration of working memory and object recognition memory (Yu et al. 2010; Duchon et al. 2021). These mice exhibit synaptic plasticity defects with decreased long-term potentiation (Yu et al. 2010). Transgenic mice with three copies of murin *Dyrk1a* highlight the role of *Dyrk1a* in causing the cognitive deficit observed in DS. Indeed, this mouse model presents a deficit in working memory as well as impaired learning and long-term spatial memory and cognitive flexibility evaluated in the Morris water maze (MWM) test (Souchet et al. 2014). In addition, an increase of dendritic spines density in the cortex leading to disturbances in the synaptic activity of the prefrontal cortex of *Dyrk1a* transgenic mice are pointed out (Thomazeau et al. 2014). Furthermore, the normalization of gene *Dyrk1a* dosage in the brain of DS mice allows the correction of cognitive deficit (Xavier Altafaj et al. 2013; García-Cerro et al. 2014). Rescue of cognitive functions is also observed after DYRK1A kinase activity normalization using pharmacologic inhibitors on DS mouse models (Souchet et al. 2014; Nguyen et al. 2018). These results reflect the major role played by DYRK1A gene dosage and in particular its kinase activity which can be used for therapeutical purposes in improving cognitive functions of people with DS

Mouse models have been crucial for deciphering basic biological mechanisms that underlie DS and MRD7 syndromes. However, treatment protocols targeting the overdosage of DYRK1A and successfully tested on those models, had more mitigated results in human (Cieuta-Walti et al. 2022). As an alternative to mice, rats have several advantages such as its physiology and behavior closer to human. Rats are also more social, they show higher levels of strategy and more stable performance in cognitive tests, making them a better model for translation to human and to increase relevance of preclinical studies. All the accumulating knowledge, using various mouse models, highlights the importance of *Dyrk1a* dosage in apparition of cognitive deficits in MRD7 and DS. However, the use of different animal models would allow a better translation to humans to further understand the disturbed mechanisms and the development of therapeutic strategies. Another animal model often used is the rat model which has many

advantages over the mouse model. Indeed, the genetic, physiology and behavior of rats are closer to humans. Rats' behavior and in particular their sociability are closer to humans, the rat is therefore a solid model for studying intellectual disability syndromes such as DS and MRD7 (Drummond et Wisniewski 2017; Do Carmo et Cuello 2013). However, rats' models were not used until the last years because of the lack of genetical manipulation system, but the discovery of CRISPR/Cas9 genome editing strategy allows to generate desired genetic mutations (Jinek et al. 2014).

We generated new rat models with either a deletion or a duplication of the *Dyrk1a* gene to complement the studies already done in mouse models. The phenotypic effects of the deletion or the trisomy of *Dyrk1a* on rat will be presented, providing evidence on the importance of *Dyrk1a* gene dosage in the onset of cognitive deficits as observed in DS and MRD7.

Materials and methods

Animals

The Dup1(*Dyrk1a*), Dup2(*Dyrk1a*) and Del(*Dyrk1a*) rat models were constructed in the Sprague Dawley outbred background with the CRISPR-Mediated Rearrangement mechanism (CRISMERE) strategy (Birling et al. 2017) at the *Institut Clinique de la Souris* (ICS, France, Illkirch). The Dup1 and Del(*Dyrk1a*) were generated with pairs of gRNA located around chr11 position 34,842,454-34,963,976 (rat genome RGSC 6.0/rn6) for a 121.7 kb interval and two other pairs of sgRNA, one located upstream and the other downstream of *Dyrk1a*, were used to duplicate a region of 219 kb containing the whole genetic region located between *Dscr3* and *Kcnj6* with the interval at position chr11:34,791,993-35,011,015. The sgRNA used are presented in **Supplementary Table 1** and were validated in vitro using Sureguide kit (Agilent Technologies #5190-7716). Injection conditions are the following: Cas9 mRNA 50-60 ng/μL and 40-60 sgRNA ng/μL (see (Birling et al. 2017) for more information).

During the behavioral testing phase, the rats are housed in groups of two in disposable plastic cages (Innocage® #R-BTM-H, Innovive, Paris, France) of dimensions 43.2x34x19.8 cm placed on ventilated racks. Rats have *ad libitum* access to water and food and are in a controlled environment with a light/dark cycle of 12 hours (light from 7:00 am to 7:00pm) and a temperature of 23±1°C. The experiments implemented in this project comply with ethical standards of the French Ministry of Agriculture (law 87 848). In addition, these projects have been validated by our local ethical committee (Com'Eth, n°17) under two authorization numbers: one for the Del(*Dyrk1a*) line (APAFIS no. #31362) and the other for the Dup2(*Dyrk1a*) line (APAFIS no. #18895). No authorization was necessary for behavioral studies realized for Dup1(*Dyrk1a*).

Genotyping

For Del(*Dyrk1a*) and Dup1(*Dyrk1a*) lines the genotype was determined using protocol 1. DNA was extracted using the DNA Extract All Reagents kit (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific) using 50 μL of lysis buffer and further incubation at 95 °C for 10 min. Then, 50 μL of neutralizing solution was added for the DNA extract. Polymerase chain reaction (PCR) reaction was done with 50 ng of DNA extract, 7.5 μL FastStart 2X PCR Master (Roche, Basel, Swiss), 100 μM primers in a total volume of 15 μL. Primers used for Del(*Dyrk1a*) genotyping

were Ef² (5'- CTGTCGTCGAGGTGCAGCATC -3') and Wr (5'- GGGGTGATGATCAGAACTGAGG -3') for the wild type allele and Ef (5'- GGCAAATTCGTGAGTCAGTGA CT C -3') and Er (5'- CTGCCACTCATACCCAGCACAAC -3') for the deleted allele. Primers used for Dup1(*Dyrk1a*) genotyping are Ef² (5'- CCTGTCGTCGAGGTGCAGCATC -3') and Er (5'- CTGCCACTCATACCCAGCACAAC -3'), these primers allow to discriminate wild type allele than the duplicated allele. The PCR reaction carried out was a thermocycler according to the following conditions: 95°C for the 4 min followed by 34 cycles of 94°C for 30s, 62°C for 30s and 72°C for 1 min and a final elongation step for 7 min at 72°C.

For Dup2(*Dyrk1a*) genotyping, we used a second protocol in which tissue DNA was digested in 100µL of lysis buffer (Direct PCR Lysis Reagent, Viagen #102-T) with 10 µL of proteinase K 10mg/mL (#P6556-1G, Sigma-Aldrich). After incubation at 56 ° C over night, the samples are moved at 95 ° C for 30 min to inactivate proteinase K. After centrifugation for 5 min at 13,000 rpm (rotations per minute), the supernatant was used for PCR with the Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA polymerase kit (Thermo Fisher Scientific, Strasbourg, France). About 100 ng DNA is added to the Polymerase Chain Reaction (PCR) mix: 4 µL Phusion HF buffer (1x), 0.4 µL dNTP (10 mM, Thermo Scientific), 0.1 µL primers (100 µM), 0.2 µL Phusion Hot Start II polymerase (10 µM) and 14.2 µL H₂O. Primer's sequence used to detect Dup2(*Dyrk1a*) allele were: F6 (5'- GACAGCAAGAAGATGAGAGTCAGG -3') and the R1 primers (5'- CCTCTGTAGGATGAGACAATAGCT -3'). The PCR reaction was first denaturation 98°C for the 30s followed by 30 cycles of 98°C for 8s, 55-65°C for 10s and 72°C for 1 min and a final elongation step for 5 min at 72°C.

All PCR products were separated by electrophoresis (30 min to 130V) according to their size on a 2% agarose gel composed with ethidium bromide (BET, 0.5 µM, Euromedex #EU0070). For Del(*Dyrk1a*) model, deleted allele present a fragment of 234 bp and wild type allele has a size of 274 bp. For Du1(*Dyrk1a*) model, a fragment of 1449 bp size is obtained for duplicated allele and a fragment of 442 bp for wild type allele. Dup1(*Dyrk1a*) model genotyping present a fragment of 443 bp for duplicated allele.

Quantification of gene copy number

Gene copy number quantification were performed on Del(*Dyrk1a*), Dup1(*Dyrk1a*) and Dup2(*Dyrk1a*) rats using the digital droplet PCR technology (ddPCR). For Del(*Dyrk1a*) analysis

was performed on n = 3 F1 generation, for Dup1(*Dyrk1a*), n = 3 and for Dup2(*Dyrk1a*) on n = 13. This experiment was realized by the Model Validation Service of ICS. DNA was extracted using the DNA Extract All Reagents kit (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific). Tail samples were digested by adding 50 µL of lysis buffer. They were then incubated at 95 ° C for 10 min. Once the biopsies are digested, 50 µL of neutralizing solution were added. The samples are then diluted 20 times for ddPCR (Lindner et al. 2021). The PCR reaction was carried out from 2 µL of samples diluted to the twentieth, to which are added 10 µL of the Supermix ddPCR 2x (without dUTP, #1863024, Bio-Rad), 250 nM of the probe coupled to a fluorophore (FAM or HEX), 750 nM of the primers (see **Supplementary Table 2** for primers and probes) for a final volume of 20 µL for each sample (Lindner et al. 2021). The samples thus prepared were fractionated into droplets using the QX200 droplet generator (Bio-Rad). The PCR reaction was carried out by depositing 40 µL of the samples on a 96-well plate. The DNA contained in the droplets was amplified according to the following conditions: 95 ° C for 10 min, followed by 40 cycles from 20s to 95 ° C, followed by a hybridization gradient between 53 and 63 ° C for 1 min, then 10 min at 98 ° C for a deactivation step. The PCR products were analyzed using the QX200 reader (Bio-Rad) to measure the fluorescence intensity of each droplet. The data was analyzed with QuantaSoft™ Analysis Pro software (Version 1.0.596).

Behavioral pipeline

A battery of behavioral experiments was performed only on males' rats with an age of 9-11 weeks at the beginning of the pipeline. For the behavioral analysis of Del(*Dyrk1a*) rats, the tests were performed with three cohorts. The first cohort of 15 Del(*Dyrk1a*) rats and 15 control disomic rats realized the following tests: Object Position Preference (OPP) with 5 min of retention, Novel Object Preference (NOP) with 1 hour of retention, NOP with 24 hours of retention with 2 objects, social interaction and the Morris Water Maze (MWM). The second cohort of 8 Del(*Dyrk1a*) rats and 8 control rats performed the following tests: Y-maze, circadian activity, open field, OPP with 5 min of retention and NOP with 24 hours of retention and 3 objects. And last cohort of Del(*Dyrk1a*) rats composed of 4 Del(*Dyrk1a*) and 2 control rats realized the OPP with 5 min of retention and NOP with 24 hours of retention and 3 objects. A single cohort of Dup1(*Dyrk1a*) rats consisting of 15 rats trisomic for *the Dyrk1a* gene and 15 control rats was generated for phenotypic analysis: open field, NOP with 1 or 24 hours of retention and 2 objects, and MWM. Three cohorts of Dup2 (*Dyrk1a*) rats were generated for

behavioral analysis. The first two cohorts were composed of 11 rats per group and performed the following tests in the order listed: circadian activity, Y-maze, open field, OPP with 5 min retention, NOP with 24 hours of retention and 3 objects, and MWM. The third cohort was used only for the OPP test (n = 7 Dup2(*Dyrk1a*) and n = 7 disomic rats).

The behavioral tests are presented in the order in which they were carried out. Behavioral experimenters were blinded concerning the genetic status of rats. Each day of test, rats were transferred to the experimental room 30 min before the beginning of the experiment. All experiments were realized between 8:00 am and 4:00 pm except for the circadian activity test which was realized for 46 hours (beginning at 11:00 am).

To assay the general locomotor and circadian activity, rats were housed in individual activity cages from 11:00 am for 46 hours (22 hours for light phase and 24 hours for dark phase) with water and food *ab libitum*. Locomotor activity cages (Tecniplast™) are transparent with dimensions of 33x20x19cm and placed in a sound-attenuated chamber. The device is composed of 4 bars of infrared sensors for each cage allowing to record locomotor activity and number of rears. The device is connected to a computer that allows different variables to be extracted using the POLY_PLUS software (Imetronic®, Marcheprie, France). The activity was evaluated in intervals of 1 hour, the first 3 hours of the test corresponding to the habituation phase.

Short-term memory was measured by recording spontaneous alternation in the Y-maze test (Kraeuter, Guest, et Sarnyai 2019). The spontaneous alternation behavior (SAB) evaluates the preference of animals to explore an arm that has not been previously explored at a frequency superior to 50%. The maze which has a Y shape, was made of three plastic arms each with different pattern to encourage SAB. Animals were placed in one arm, facing away the wall of the arm and arms were cleaned between each rat with 50° ethanol. The starting arm was alternated randomly for each rat to prevent bias. Animals were allowed to explore arms during 8 minutes under moderate light (15 lux in the center region). The latency to leave the starting arm, the total entries and the number of SAB were recorded. The sequence of entries in the 3 arms were recorded considering the rat enters an arm when all four paws were inside the arm. Alternation was quantified and one alternation correspond to successive entries of the three different arms. The number of alternations was then divided by the number of alternation opportunities namely corresponding to total arm entries minus one.

Open field (OF) was used to assay locomotor activity, anxiety and exploratory behavior of rats. This test was done in an open square with opaque black walls of dimensions 90x90x40cm, and the light intensity is set to 15 lux in the center of the OF. Rats' movement and rears were recorded by infrared beams during a session of 30min using the POLY_OPENFIELD software. After each trial, arena was cleaned with 50° ethanol to minimize olfactory cues. Speed and distance traveled were analyzed during 3-time sequences (0 to 10 min; 10 to 20 min and 20 to 30 min). We also recorded the time spent in each arena zone (center and peripheral).

Short-term spatial memory was assessed using the Object Position Preference (OPP) task. This test is based in the innate tendency of rodents to spend more time exploring an object moved than another which was not moved (Ennaceur, Neave, et Aggleton 1997). This test was performed in two days: the first day corresponds to the habituation to the open field in which an allothetic symbol is placed (15 min of habituation). During the second day, two identical objects were presented to the rat during 3min, at the end of presentation time animal will return in his cage during 5min of retention. One of the objects was moved to a new position, and the rat was allowed to explore freely the objects during 3min. The object moved was randomized between each rat to avoid location preference. Once the test phase was over, the arena and objects were cleaned with 50° ethanol before going to the next rat. Object exploration was manually scored and defined as the orientation of the nose to the object to a distance less than or equal to 2 cm. For the assessment of spatial memory performance, the percentage of time exploring the novel position vs the familiar position was calculated.

The Novel object preference (NOP) test allows to measure the recognition memory and is based on the innate tendency of rodents to explore novel objects over familiar ones (Ennaceur et Delacour 1988). This test was done in the same open field as the OPP task in three steps. Different protocol of NOP were used for rats model characterization, with different retention time and different objects number used: NOP with two objects and 1 hour of retention for Dup1(*Dyrk1a*) rats, NOP with two objects and 24 hours of retention for Del(*Dyrk1a*) and Dup1(*Dyrk1a*) rats and NOP with three objects and 24 hours of retention for Del(*Dyrk1a*) and Dup2(*Dyrk1a*) rats. First step, rats were habituated to the empty arena during 15 min. The second step, 24 hours later, corresponds to the memory acquisition phase. At this step, two or three different objects are presented to the rats during 3 min. The third step corresponds to the retention test and was done with two retention time, either 1 hour or 24

hours after the phase of presentation. For this last session, one of the two or three objects was replaced by a novel object and rats were free to explore the objects during 3 min. Different objects were used and the choice of objects and location of the novel object were randomized for each genotype to avoid object and location preference. Object exploration were manually scored and defined as the orientation of the nose to the object to a distance less than or equal to 2 cm. The percent of time exploring familiar vs novel objects was calculated to assess recognition memory ability. Between each rat, field and objects were cleaned with 50° ethanol between each rat to avoid object and location preference.

Long-term spatial learning and memory was analyzed with the Morris water maze (MWM). The water maze was a circular pool (diameter of 160cm and height of 80cm) filled with water maintained at $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, made opaque using a black paint (Gouache Redimix Noire #188039, Le Franc Bourgeois). The maze was split into 4 quadrants: South-East (SE), North-West (NW), North-East (NE) and South-West (SW). The escape platform (diameter of 10 cm) was submerged 3cm below the water's surface, so the rats were not able to see it. The light intensity of the test room was set to 70lux at the platform level. This experiment was performed to study reference memory through a spatial search strategy that involved finding a hidden platform in the maze using allothetic symbols placed on the walls around the pool. The acquisition phase of this test consisted of a 5-day learning phase with four 60 second trials per day. Each trial started with rats facing the interior wall of the pool and ended when they climbed onto the platform located on the NE quadrant or after a maximum searching time of 60 sec. The starting position was changed pseudo-randomly between trials. 24 hours after the last day of acquisition, rats were given a 60 sec probe test in which the platform had been removed. The distance traveled in each quadrant (NW, NE, SW and SE) was recorded to quantify the time spent in the target quadrant. Finally, 24 hours after the probe test, an index platform test (cue) was carried out to highlight potential visual or motivational problems. The platform was indicated by attaching a metal rod with a black and white polystyrene ball at its end. Each rat performed 4 tests, with a maximum duration of 60s. The sequence of release points, identical for all rats, was as follows: NE – SO – NO – SE. For the acquisition and index platform session, the distance travelled, velocity and latency to reach the platform were estimated with video tracking software (Ethovision, Wageningen, Netherlands).

Based on the fact that rodents are social animals accustomed to living in groups, the social interaction test makes it possible to highlight alterations in sociability in our rat models. The test was carried out in the same device as the open field test (15 lux of room intensity). Two rats from different home cages and with the same genotype were placed in the arena. The test lasts 10 minutes and the arena was cleaned with 50° ethanol between each session. Using software (Ethovision, Wageningen, Netherlands) the number of times a social interaction occurred, and the duration of each interaction was quantified. The different interactions studied were following, pawing and sniffing head/head and head/posterior.

Statistical analysis of behavioral results

The statistical analyses were carried out with Graphpad Prism software, and a summary of all statistical results was included in Supplementary table 1. All data were expressed as mean group value \pm standard error of the mean (SEM). The normal distribution of the data was checked by the Agostino-Pearson test and homogeneity of variances by the Brown-Forsythe test. Statistical difference between groups was analyzed with one way-ANOVA (open field) or two-way ANOVA (Circadian activity, MWM and NOP with 2 or 3 objects). In lack of normal data distribution or homogeneity of variances a Kruskal-Wallis non-parametric test was performed. The post hoc test (Sidak or Tukey) was conducted only if the F value in ANOVA achieved 0.05 level. For the Y-maze, OPP and NOP (with 2 or 3 objects), we performed a one sample *t*-test on the percentage of novel object/position sniffing time or on the percentage of spontaneous alternation versus 50% (Y-maze, OPP, NOP with 2 objects) or 33% (NOP with 3 objects). A Student *t*-test was performed to compare rat models to controls (molecular analysis, circadian activity, open field and social interaction test). The significance threshold was set at $p < 0.05$.

RNA preparation

Hippocampus from Dup2(*Dyrk1a*) males rats with their littermate controls (N=5 per group) were isolated and flash frozen in liquid nitrogen. Total RNA extraction was done using RNA extraction kit (Quiagen, Venlo, The Netherlands) according to the manufacturer's instruction. Total RNA quality was checked using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). cDNA synthesis was performed using the SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Targeted gene expression analysis

For *Dscr3* and *Kcnj6* levels, PCR were realized with TaqMan® Universal Master Mix II and pre-optimized TaqMan® Gene Expression assays (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA). mRNA expression profiles were analysed by real-time quantitative PCR using TaqMan™ universal master mix II with UNG in a realplex II master cycler Eppendorf (Hambourg, Germany). The complete reactions were subjected to the following program of thermal cycling: 1 cycle of 2 minutes at 50°C; 1 cycle of 10 minutes at 95°C; 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 1 minutes at 60°C. Efficiencies of the TaqMan assays were checked using cDNA dilution series from extracts of hippocampal sample. Normalization was performed by carrying out in parallel the amplification of three housekeeping genes (*Gnas*, *Pgk1* and *Atp5b*) coupled to the GeNorm procedure to correct the variations of the amount of source RNA in the starting material. All the samples were tested in triplicate. The analysis of *Dyrk1a* level was performed using the ddPCR technology which is more precise than classical qPCR. The experimental procedure is the same than the gene expression assay. For *Dyrk1a* primers used are forward 5'- GCCATGGACTGTGAGACACATA -3' and reverse 5'- GCCATGGACTGTGAGACACATA -3'. The probe used for *Dyrk1a* analysis was derived from an Universal Probe Library System which correspond to a short hydrolysis probe (labelled at 5' end with fluorescein (FAM) and at the 3' end with a dark quencher dye) substituted with Locked Nucleic Acids. For normalization *Hprt* gene was analyzed with the primers: forward 5'- CCCCAAATGGTTAAGGTTGC -3' and reverse 5'- AACAAAGTCTGGCCTGTATCC -3'. Probe used was a ZEN™ probe with double-quenched probes labelled with a specific fluorochrome (HEX): 5'- CTTGCTGGTGAAAAGGACCTCTCGAA -3'.

Protein level analysis

Hippocampal tissues were isolated by decapitation/dissection of 3-month-old rats and flash frozen in liquid nitrogen. Samples were lysed in ice-cold sonication buffer supplemented with Complete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche, #11873580001). Samples were disaggregated, centrifuged at 4°C for 30 minutes at 14000 rpm, diluted in 5X loading buffer (Pierce Lane Marker Thermo Scientific™, #39001) containing β-mercaptoethanol and incubated at 95 °C for 5 min. Protein concentration was determined by Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, #23225). Per well, 30 µg of protein was loaded onto a polyacrylamide gel composed of Tris-Glycine-SDS (25 nM Tris, 192 nM Glycine, 0.1% SDS).

Proteins were transferred to nitrocellulose membranes by Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (BioRad, France) using the MIXED MW Bio-Rad Pre-programmed Protocol. Then, blots were incubated overnight at 4°C with the blocking solution: 5% milk, 1X Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20 (TBS-T) and incubated with primary antibody diluted in blocking solution overnight at 4°C. Blots were washed in TBS-T and incubated with 1:10.000 HRP conjugated Goat anti-mouse secondary antibody (#PO447 Dako, France, 1:10.000) diluted in blocking TBS-T, 1 hour at room temperature. Proteins were visualized with Amersham™ Imager 600 and signals were quantified using ImageJ and the statistical analysis with GraphPad. Primary antibodies used: mouse monoclonal anti-DYRK1A C-terminal (#H00001859-M01, Thermo Fisher, 1:1.000), mouse monoclonal anti-β-actin–peroxidase antibody (#A3854 Sigma, 1:150.000) and a mouse monoclonal anti-GAPDH antibody (#MA5-15738 ThermoFisher, 1:5.000). Relative amount of DYRK1A protein was measured as the ratio of the signal detected for DYRK1A compared to the β-actin or GAPDH signal detected and normalized by the mean signal of the wild type samples.

Protein kinase assay

The proteins were extracted from cryofreezing half-brains of rats of the *Del(Dyrk1a)* and *Dup2(Dyrk1a)* models. Proteins were first extracted in the following lysis buffer: 60 mM β-glycerophosphate, 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 and protease inhibitors (Roche, #11873580001). The proteins were then dosed with the Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher #23225). DYRK1A catalytic activity dosage was determined as described in (Bui et al. 2014) publication. Assays were performed in a 96-well ELISA plate in a total volume of 50 μL consisting of kinase buffer (50 mM Tris–HCl, 10 mM DTT and 5 mM MgCl₂), ATP (up to 1000 μM), FAM–peptide substrate (up to 60 μM), and brain extracts (100 μg total protein extract). Briefly, samples containing the enzyme were preincubated with peptide substrate at 37 °C for 1 min and the reaction was started by the addition of ATP. At different time points (up to 30 min), 50 μl of HClO₄ (15% in water) was added to stop the reaction, and 20 μl was automatically injected into the HPLC column. The kinetic parameters for two-substrate kinetics were determined by fitting the data iteratively to the equation $V_i = V_{max}[S_A][S_B]/(K_{AB} + K_{mB}[S_B] + K_{mA}[S_B] + [S_A][S_B])$ using the program Prism 5 (GraphPad Software).

Transcriptomic analysis

Transcriptome profile of the rat hippocampus isolated from Del(*Dyrk1a*) and Dup2(*Dyrk1a*) rats models was analyzed with a specific bioinformatics pipeline and controlled for quality prior to and after data pre-processing and normalization (for more information see (Duchon et al. 2021)). The differential expressed genes (DEG) were identified using a method based on fold-change (FC) rank-ordering statistics (FCROS) (Dembélé 2019). In the FCROS method, k pairs of test/control samples were used to compute FC which ranked in increasing order and ranks obtained were associated with genes. Then, k ranks of each gene were used to calculate a statistic and resulting probability (f -value). After fixing the error level at 5% false discovery rate (FDR) the f -value allowed to identify the DEGs after. Functional differential analysis using GAGE was performed (Luo et al. 2009) and detail of this analysis could be found in a previous publication from our lab (Duchon et al. 2021).

Results

Generation and validation of new Del(*Dyrk1a*) and Dup(*Dyrk1a*) rat models

A segmental deletion and a segmental duplication (11:34842454-34963976, Ensembl 91 database, GRCh38.p10) of 121.7 kb were generated by CRISPR-Cas9 to produce the Del(*Dyrk1a*) and Dup1(*Dyrk1a*) rat models respectively. The DNA segment included the *Dyrk1a* gene and a small non-coding region (**Fig. 1A**). *Dyrk1a* gene copy number was validated using ddPCR with one copy found in the Del(*Dyrk1a*) model and three copies in the Dup1(*Dyrk1a*) model relative to two copies in the disomic control (wild type, wt) (**Fig. 1B**). In order to validate the amount of DYRK1A protein expressed in the two rat models, a western blot analysis was performed on hippocampal tissues of adult rats. A decrease of 42% in the expression level of DYRK1A was found in the Del(*Dyrk1a*) model. However, the quantity of DYRK1A protein was not increased in Dup1(*Dyrk1a*) rats compared to disomic controls (**Fig. 1C**). We supposed that this might be due to absence in the duplicated region of some *Dyrk1a* regulatory sequences. We therefore generated a new model named Dup2(*Dyrk1a*) with a larger duplication (219 kb; 11:34791993-35024196, Ensembl 91 database, GRCh38.p10) of DNA non-coding region around *Dyrk1a* (**Fig. 1A**). After validation of the presence of three copies of *Dyrk1a* in the Dup2(*Dyrk1a*) model (**Fig. 1B**), we showed that the amount of DYRK1A protein was increased in the hippocampus of Dup2(*Dyrk1a*) animals (**Fig. 1C**). To verify that the duplication in the Dup2(*Dyrk1a*) model did not impact the expression of genes on both sides of the duplication, we analyzed the mRNA expression of the *Dscr3* and *Kcnj6* genes present on either side of *Dyrk1a* in the hippocampus by quantitative RT-PCR. Results show that duplication of *Dyrk1a* does not impact the expression of *Dscr3* and *Kcnj6* and highlight a 58% increase in *Dyrk1a* expression (**Fig. 1D**), indicating that DYRK1A is overexpressed in the Dup2(*Dyrk1a*) without affecting the neighboring genes *Dscr3* and *Kcnj6*. Moreover, to validate the impact of the deletion of *Dyrk1a* in Del(*Dyrk1a*) a dosage of this activity was measured in brain extracts (**Fig. 1E**). As expected, a decrease of *Dyrk1a* activity in the brain of Del(*Dyrk1a*) compare to disomic rats.

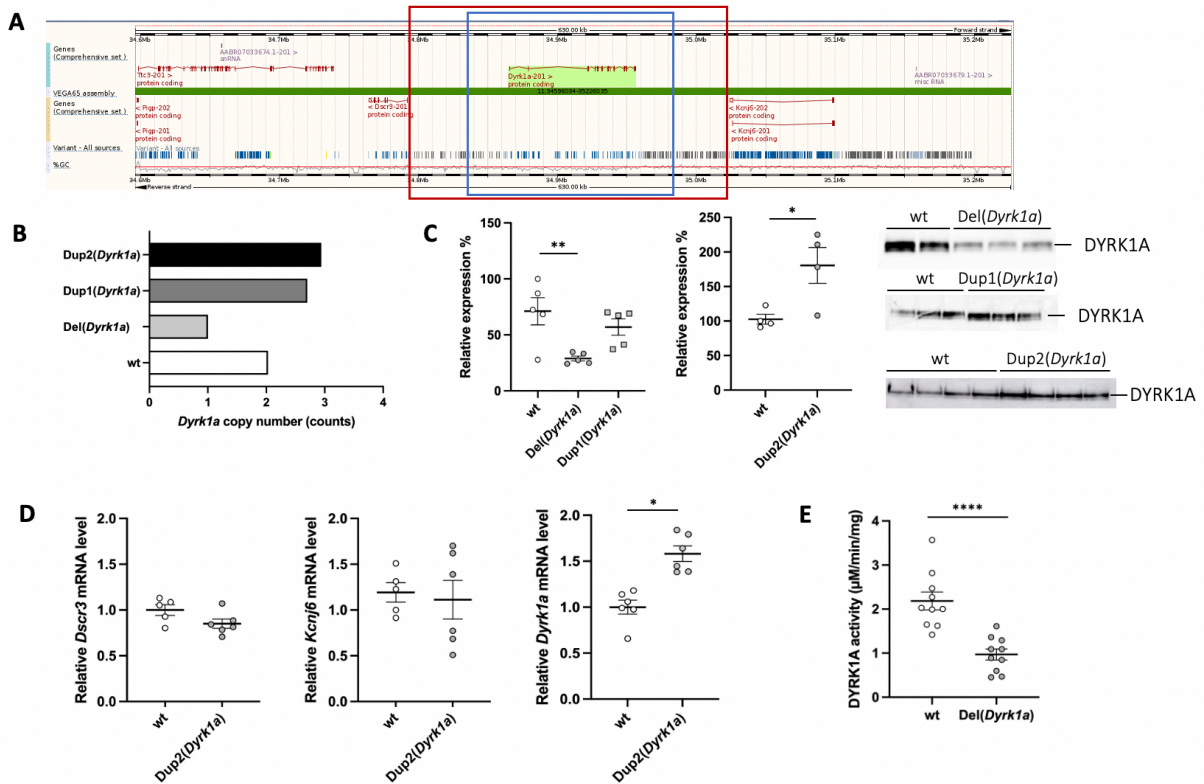


Fig. 1: Validation of the construction of the *Del(Dyrk1a)*, *Dup1(Dyrk1a)* and *Dup2(Dyrk1a)* rat models

(A) The 121.7 kb (blue rectangle) deleted and duplicated region in the *Del(Dyrk1a)* and in the *Dup1(Dyrk1a)* models respectively and the 219 kb (red rectangle) duplicated region in the *Dup2(Dyrk1a)* model, as shown from a capture derived from the UCSC genome browser (<http://genome.ucsc.edu/>). (B) Analyse of *Dyrk1a* copy number by ddPCR in the three rat lines. Results show one copy of *Dyrk1a* in *Del(Dyrk1a)* and three copies in *Dup1(Dyrk1a)* and *Dup2(Dyrk1a)* lines (n=1 per group is represented). (C) Quantification of immunoblots of DYRK1A protein in the hippocampus of the different rat models relative to control disomic rats. Results show a decrease of DYRK1A expression in *Del(Dyrk1a)* compared to disomic rats but no difference of protein expression was obtained in *Dup1(Dyrk1a)* rats compared to control ones (One-way ANOVA: $F_{2,12}=6.740$; ** $p<0.01$). Increase of DYRK1A protein expression is observed in *Dup2(Dyrk1a)* (Student's *t*-test: * $p<0.05$). Immunoblot images are on the right side. Data are presented as point plots with mean±SEM (n=5 rats for *Del(Dyrk1a)* and *Dup1(Dyrk1a)* and n=4 rats for *Dup2(Dyrk1a)*). (D) Relative mRNA level expression of *Dscr3*, *Kcnj6* and *Dyrk1a* genes in *Dup2(Dyrk1a)* to control disomic rats. No difference of mRNA levels for *Dscr3* and *Kcnj6* was observed in *Dup2(Dyrk1a)* compared to disomic rats while a 50% increase in *Dyrk1a* mRNA

expression is observed in Dup2(*Dyrk1a*) compared to controls (Student's *t*-test: * $p < 0.05$). Data represent the mean \pm SEM ($n=5$ wild type and $n=6$ Dup2(*Dyrk1a*)). (E) DYRK1A kinase activity in Del(*Dyrk1a*) rat model. Kinase assay was realized on brain extract. Results show a decrease of DYRK1A activity in Del(*Dyrk1a*) compared to wild type (Student's *t*-test: **** $p < 0.0001$, $n=10$ per group).

***Dyrk1a* deletion in rat model leads to locomotor activity and spatial memory deficit**

First, the impact of *Dyrk1a* gene haploinsufficiency was evaluated on animals' weight, measured at the beginning of behavioral pipeline (aged 9-12 weeks). Values shown a significant decrease of Del(*Dyrk1a*) rats weight compare to control animals (**Suppl. Fig 1A**). Then, we determined the impact of *Dyrk1a* on rat cognition using a battery of behavioral. The circadian activity and open field tests were used to evaluate the locomotor activity of rats. Locomotor activity during the circadian test was recorded during 46 hours from day 1, 11:00 am until day 3, 11:00 am. Diurnal activity was analyzed by grouping together data from the two diurnal phases (5 and 12 from respectively from the first and second day) and the nocturnal activity (12 hours by night) – without habituation phase – by grouping data from the two nocturnal phases. A decrease of Del(*Dyrk1a*) rats mean locomotor activity was noticed only during nocturnal session (**Fig. 2A**). In addition, a decrease in the number of rears throughout the test was observed in Del(*Dyrk1a*) rats compared to controls (**Fig. 2A**). Further analysis of each sessions, during the habituation (3 first hours), diurnal and nocturnal showed that locomotor activity of the Del(*Dyrk1a*) rats compare to control littermates was only decrease during the habituation and nocturnal phase 1 (**Suppl. Fig. 1B**). Exploratory activity was analyzed in the open field. Del(*Dyrk1a*) rats exhibited a decrease in locomotor activity in with a reduction of the total distance travelled compare to control (**Suppl. Fig. 1B**). This was due to a decreased activity during the 10 first minutes of exploration of the arena, reflecting an hypoactivity in those animals (**Fig. 2C, left**). The decrease of locomotor activity of Del(*Dyrk1a*) was seen for the distance travelled at the periphery and not in the center of the arena (**Fig. 2C, right**). Hypoactivity of Del(*Dyrk1a*) rats in the OF was also observed in the vertical activity with a significant decrease of rears (**Suppl. Fig. 1C**).

Subsequently, cognitive abilities were evaluated with Y-maze (working memory), Object Place Preference (OPP) with 5 minutes of retention (short-term spatial memory), Novel Object Preference (NOP) with two objects or three objects (recognition memory) and Morris Water

Maze (MWM, long-term spatial learning and memory) in 9-12-week-old males. Y-maze results did not reveal significant difference between *Del(Dyrk1a)* rats and disomic rats for the percentage of spontaneous alternation (**Fig. 2C**). The deletion of *Dyrk1a* in rats therefore did not induce a deficit in working memory. The number of visited arms and exit latency were comparable between the 2 groups, and hence that the *Del(Dyrk1a)* rats did not present any change in their behavior compared to control indicating that they don't show any anxiety behavior (**Suppl. Fig. 1D**). The OPP test with 5 min retention revealed that, unlike controls, *Del(Dyrk1a)* rats were not able to discriminate the new position from the familiar one (**Fig. 2D**). These results showed an alteration of the short-term spatial memory in *Del(Dyrk1a)*. The NOP test with 2 objects highlighted that *Del(Dyrk1a)* rats, like the controls, were able to differentiate the novel object (No) versus from the familiar object (Fo) (**Fig. 2E, left**). The lack of performance deficit of the *Del(Dyrk1a)* rats in this test, contrary to *Dyrk1a^{+/-}* mice, might be due to the fact that this test is too simple for the rats compared to mice (Arqué et al. 2008). Hence, we decided to choose a more complex NOP test by going through the presentation of 3 different objects. For this test, *Del(Dyrk1a)* rats like control rats, spent more than 33% on the No object (**Fig. 2E, right**). As a result, *Del(Dyrk1a)* rats did not have a deficit in recognition memory. In the MWM, during the learning phase with the hidden platform, the distance travelled by two genotypes to find the platform decreased during the five days of acquisition, reflecting a platform localization learning (**Fig. 2F, left**). However, *Del(Dyrk1a)* rats travelled a greater distance to find the platform than control rats during this phase with a significative difference at days 2 and 3. These results highlighted that the learning capacity, although still present, was decreased in *Del(Dyrk1a)* rats. During the probe test, both genotypes presented a significant preference for the targeted quadrant compared to hazard (25%) indicating no long-term spatial deficit (**Fig. 2F, right**). Moreover, analysis of swimming speed to reach the platform during the probe test did not reveal any significative difference between genotype, indicating no visual or motivational deficit (**Suppl. Fig. 1E**). Finally, the number of platform crossing was similar in the two genotypes, indicating that control and *Del(Dyrk1a)* rats remember precisely the localization of the platform and do not present alteration of motor skill (**Suppl. Fig. 1E**).

The *Del(Dyrk1a)* model representing a model of syndrome with autism spectrum disorder, we wanted to check social interaction, looking at different behavior in a defined environment between two stranger rats with the same genotype. Analyzing the percentage of

time each pair of animals spent having social interactions, we found a decreased in the duration of social interactions in *Del(Dyrk1a)* rats compared to controls (**Fig. 2G, left**). More precisely, a reduction of the time spent “following” and “pawing” was observed among *Del(Dyrk1a)* compared to control rats (**Fig. 2G, right**), unraveling an alteration of *Del(Dyrk1a)* rat social interaction abilities.

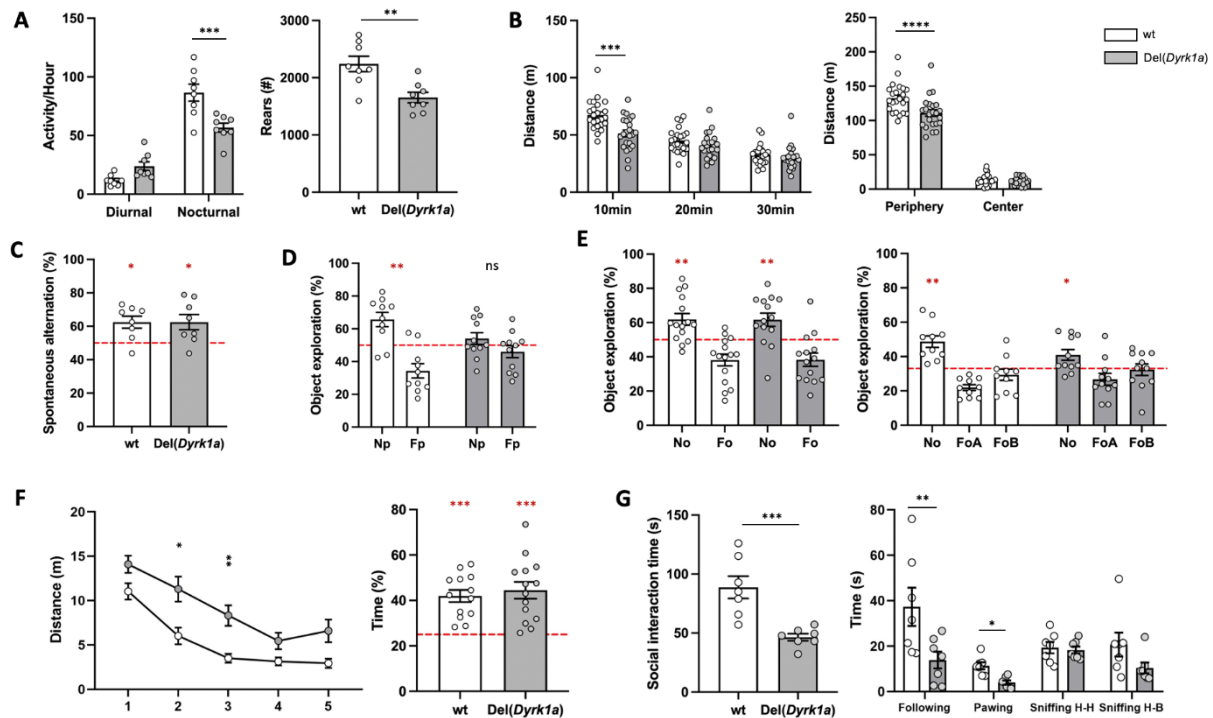


Fig. 2: Impact of *Dyrk1a* deletion at the behavioural level on rat model

Del(Dyrk1a) rats represented in grey and disomic control rats are in white. **(A)** Circadian locomotor activity per hour during the diurnal and nocturnal phases of the test (*left*) and the total number of rears during the whole recording (*right*). Data show a decrease of mean locomotor activity of *Del(Dyrk1a)* during nocturnal phase (two way ANOVA: $F_{1,14}=38.84$; Šídák post-hoc: *** $p<0.001$ *Del(Dyrk1a)* vs control rats; $n=8$ per group). Number of rears is decreased in *Del(Dyrk1a)* compared to controls (Student *t*-test: ** $p<0.01$; $n=8$ per group). **(B)** Analysis of the distance travelled in a new environment recorded in the OF by increments of 10 minutes (*left*) and by zone (periphery and center; *right*). The distance travelled during the first 10 minutes was significantly lower in *Del(Dyrk1a)* compared to disomic rats (two-way ANOVA: $F_{1,44}=9.074$; Šídák post-hoc: *** $p<0.001$ disomic vs *Del(Dyrk1a)* rats). *Del(Dyrk1a)* travelled less distance in periphery than control rats (two-way ANOVA: $F_{1,44}=9.330$; Šídák post-hoc: **** $p<0.0001$; $n = 23$ per group). **(C)** Percentage of spontaneous alternation in Y-maze. One sample

t-test vs 50% (hazard) show Del(*Dyrk1a*) and disomic rats performed in the test (* $p < 0.05$; $n = 8$ per genotype) **(D)** OPP test with 5 minutes of retention. Results are presented as the percentage of exploration time of the object with the new position (Np) and the object which was not moved (Fp). One sample *t*-test vs 50% (hazard) showed Del(*Dyrk1a*) failed to recognize Np object (ns = non significant, ** $p < 0.01$; $n = 10$ wild type and $n = 11$ Del(*Dyrk1a*)). **(E)** NOP test with 24 hours of retention at two objects (*left*) or three objects (*right*). Results show the percentage of exploration time of Novel object (No) and Familiar objects (Fo, FoA, FoB). For NOP with two objects, Del(*Dyrk1a*) rats discriminate the No from the Fo (one sample *t*-test: ** $p < 0.01$ No vs 50%; $n = 15$ per genotype). For NOP with three objects, on sample *t*-test vs hazard indicate that control and Del(*Dyrk1a*) rats explored more time than 33% the No (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; $n = 10$ control and $n = 11$ Del(*Dyrk1a*)). **(F)** Mean of the distance travelled during the four trials for each day of acquisition session (*left*) and percentage of time spend on the target quadrant (NE) during probe test session (*right*) in MWM. Two-way repeated measures ANOVA (Genotype x Day) show a significant decrease of distance traveled between day 1 and day 5 for two genotypes reflecting (Day effect $F_{2,810,75.67} = 39.10$; Tukey post-hoc: $p < 0.0001$ D1 vs D5 for control, $p < 0.01$ D4 vs D5 for Del(*Dyrk1a*)). During the second and third days of acquisition Del(*Dyrk1a*) travelled more distance than disomic rats ($F_{2,810,75.67} = 39.10$; Šídák post-hoc: * $p < 0.05$ control vs Del(*Dyrk1a*) for D2, $p < 0.01$ Del(*Dyrk1a*) vs control for D3). For the probe test, one sample *t*-test vs 25% (hazard) show that two genotypes spend more time in the target quadrant (***) $p < 0.001$; $n = 14$ per group). **(G)** Total time spent having different social interactions (*left*) and the duration of each different social behaviour (*right*): following, pawing, sniffing head-head and sniffing head-back. Results indicate a decrease of total social interaction time (*left*) and a reduction of following behaviour (*right*) in Del(*Dyrk1a*) compared to disomic rats (Student *t*-test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; $n = 7$ per group).

Overexpression of *Dyrk1a* in rat partially mimic cognitive deficit observed in transgenic *Dyrk1a* mice

For the phenotyping characterization of the Dup1(*Dyrk1a*) rat model, locomotor activity was evaluated with the OF test, cognitive skills were measured with the NOP for recognition memory and the MWM for spatial long-term learning. We verified as expected from the absence of DYRK1A overexpression in this model, that no locomotor or cognitive alterations were observed in Dup1(*Dyrk1a*) rats (**Suppl. Fig 2**).

Analysis of Dup2(*Dyrk1a*) do not reveal any difference between Dup2(*Dyrk1a*) rats and control animals at 9-12 weeks age (**Suppl. Fig. 3A**). *Dyrk1a* gene trisomy do not impact rats body weight. To characterize *Dyrk1a* trisomy effect on rats behavior a more detailed behavioral pipeline was made for the Dup2(*Dyrk1a*) rat model in which DYRK1A overexpression was validated. As in the previous study, we first focused our attention on the locomotor activity. The circadian activity test (**Fig. 3A**) showed a decrease in locomotor activity in *Dyrk1a* trisomic rats during the nocturnal phase. Analyze of the habituation, diurnal and nocturnal phase revealed that the locomotor hypoactivity of Dup2(*Dyrk1a*) was seen in the average nocturnal activity (**Suppl. Fig. 3B**). Moreover, no difference was found between the two genotypes for the number of rears throughout the test (**Suppl. Fig. 3B**). Like Del(*Dyrk1a*) rats, trisomic rats for *Dyrk1a* have a hypoactivity during the circadian test, but only for the nocturnal phase. However, contrary to Del(*Dyrk1a*), an increase of distance travelled by Dup2(*Dyrk1a*) rats in OF test was noticed during the 10 first minutes of exploration and discovery of the arena (**Fig. 3B**). This hyperactivity was not seen in the total distance travelled during the 30 minutes of the test (**Suppl. Fig. 3C**). Results reflect a hyperactivity of Dup2(*Dyrk1a*) rats, however less pronounced than the Del(*Dyrk1a*) rats hypoactivity. Indeed, Dup2(*Dyrk1a*) rats, contrary to Del(*Dyrk1a*) rats, did not present any difference with control animals in the number of rears during the test (**Suppl. Fig. 3C**). In addition, a reduction of distance travelled by Del(*Dyrk1a*) was observed in periphery of arena whereas no difference between Dup2(*Dyrk1a*) and disomic rats was seen for distance travelled in periphery or center (**Fig. 3B**). Dup2(*Dyrk1a*) do not present alteration of anxious behavior.

Then, we evaluated different types of memory: the working memory, position recognition memory, object recognition memory and long-term spatial learning and memory. Unlike mice transgenic for the *Dyrk1a* gene, Dup2(*Dyrk1a*) rats did not have a spontaneous alternation deficit in the Y maze test (**Fig. 3C**), suggesting that they have normal working memory (Atas-Ozcan et al. 2021). Moreover, no difference between genotype was found in the number of arms visited or the exit latency of the starting arm (**Suppl. Fig. 3D**). The results of the OPP test presented in **Fig. 3D** showed an alteration of short-term spatial memory in Dup2(*Dyrk1a*) rats as observed for the Del(*Dyrk1a*) rats. In addition, in the 3-object NOP test, even if Dup2(*Dyrk1a*) rats spent more than 33% (value corresponding to hazard) exploring the novel object (No), they did not spent significantly more time exploring the No from the familiar

ones, reflecting an alteration of their recognition memory (**Fig. 3E**). Finally, the MWM test shows that Dup2(*Dyrk1a*) animals did not have a deficit in learning and long-term spatial memory (**Fig. 3F**). Analysis of swimming speed and cross number during the MWM recall test showed no significant difference between Dup2(*Dyrk1a*) and control rats in their swimming activity. Dup2(*Dyrk1a*), like Del(*Dyrk1a*) rats, present with normal motor function and remember the exact location of the platform (**Suppl. Fig. 3D**).

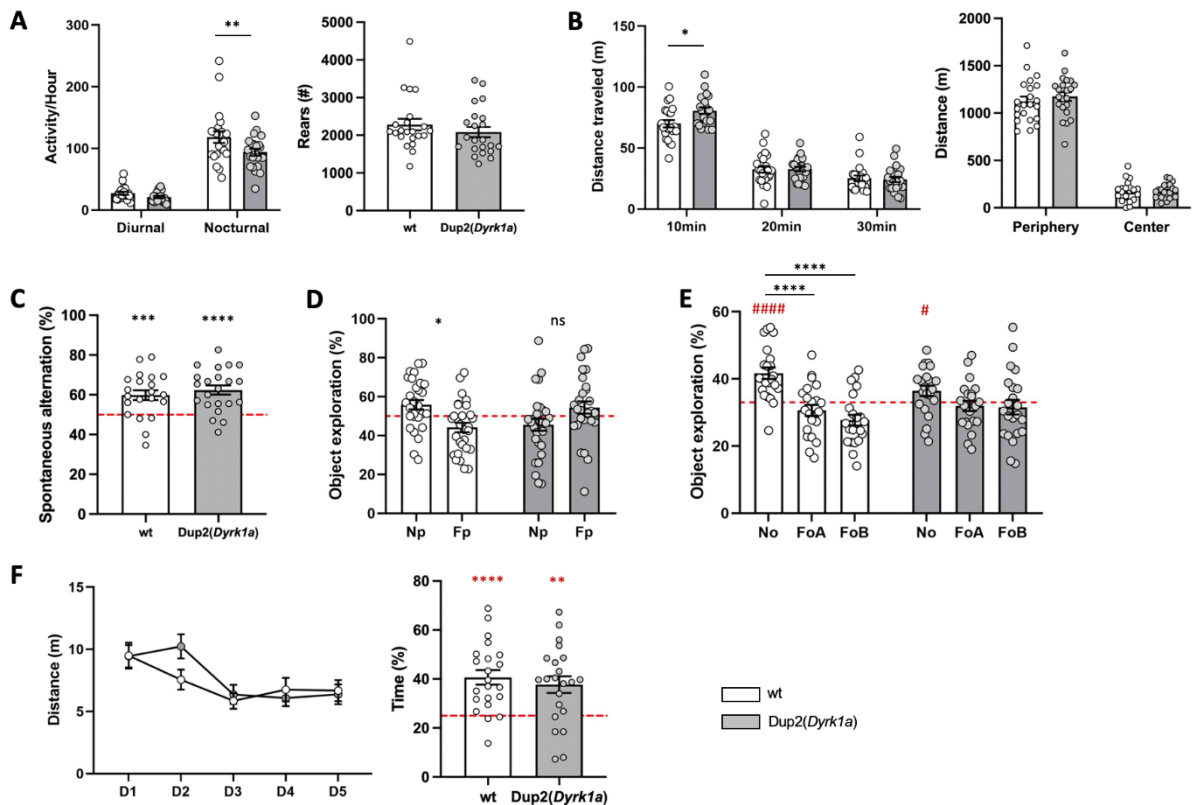


Fig. 3: Behavioural phenotyping of Dup2(*Dyrk1a*) rat line.

Grey and white represent respectively Dup2(*Dyrk1a*) and disomic control males' rats. **(A)** Mean locomotor activity per hour during diurnal and nocturnal phases of the circadian activity test. Data showed a decrease of Dup2(*Dyrk1a*) activity during nocturnal phase of the test (two-way ANOVA, $F_{1,45}=5.755$; Šídák post-hoc: $*p<0.05$ Dup2(*Dyrk1a*) vs control rats; $n=22$ per group). **(B)** Distance travelled by increments of 10 minutes in the OF showed an increase during the 10 first minutes of the test when comparing Dup2(*Dyrk1a*) to control littermates (two-way ANOVA, $F_{2,84}=4,647$; Šídák post-hoc: $*p<0.05$). No difference was observed between the two genotypes for distance travelled in different zone of arena (two-way ANOVA: $F_{1,42}=0.8462$; $n=22$ per group). **(C)** Percentage of spontaneous alternation. One sample *t*-test vs 50% (hazard) showed Dup2(*Dyrk1a*), like wild type, performed in the test ($***p<0.001$, $****p<0.0001$; $n=21$ controls

and n=22 Dup2(*Dyrk1a*)). **(D)** Object Place Recognition test with 5 minutes of retention. The analysis of the mean exploration time of objects in percentage with the new position (Np) and of the familiar object (Fp) using a sample *t*-test vs 50% (hazard) highlighted that Dup2(*Dyrk1a*) failed to recognize the Np (ns = non significant, ** $p < 0.01$, n=29 per group). **(E)** Novel Object Recognition test with 24 hours of retention and three objects. Results are presented as percentage of exploration time of the Novel object (No) and Familiar objects A and B (FoA, FoB). Dup2(*Dyrk1a*) rats failed to discriminate No from FoA and FoB (two-way ANOVA, $F_{2,126}=3,725$, **** $p < 0.0001$; one sample *t*-test compared to 33%: # $p < 0.05$, ##### $p < 0.0001$; n=22 per group). **(F)** Acquisition session (*left*) and probe test session (*right*) in MWM. Results are presented as the mean \pm SEM of the distance travelled during the 5 days of acquisition (*left*) and in percentage of time spend in the target quadrant (*right*). No difference in the distance travelled during the acquisition days was observed between wild type and Dup2(*Dyrk1a*) rats. In the probe test, both wild-type and Dup2(*Dyrk1a*) rats spend more time in the target quadrant (One sample *t*-test vs 25% (hazard), ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$; n=22 per group).

Impact of *Dyrk1a* deletion on adult rat transcriptome profile

To highlight the impact of a *Dyrk1a* gene monosomy on the adult rat transcriptome, a transcriptomic analysis was performed on adult hippocampi and compared to control littermates. We identified 723 differential expressed genes corresponding to 65 % protein-coding genes and 25% non-coding genes involved in 222 de-regulated pathways, identified by GAGE (Generally applicable gene set enrichment for pathway analysis) (Luo et al. 2009). From the 222 altered pathways the analysis highlighted the most affected groups (**Fig. 4A**) with the metabolism encompassing 31% of the total pathway, enzymes activity 24%, synapse 17% and transcription & epigenomic regulation 15 % (**Figure 4B**). Of particular interest, synaptic function was common to 39 of those pathways. Synaptic function pathways were upregulated and linked to learning and memory, axons and dendrites morphogenesis, synapse assembly, modulation of synapse transmission, post-synapse density and specialization. These results unraveled a high impact of *Dyrk1a* haploinsufficiency over a large range of molecular functions and

biological processes and pathways and pointed at the impact of *Dyrk1a* in key pathways for learning and memory deficits, observed in this model.

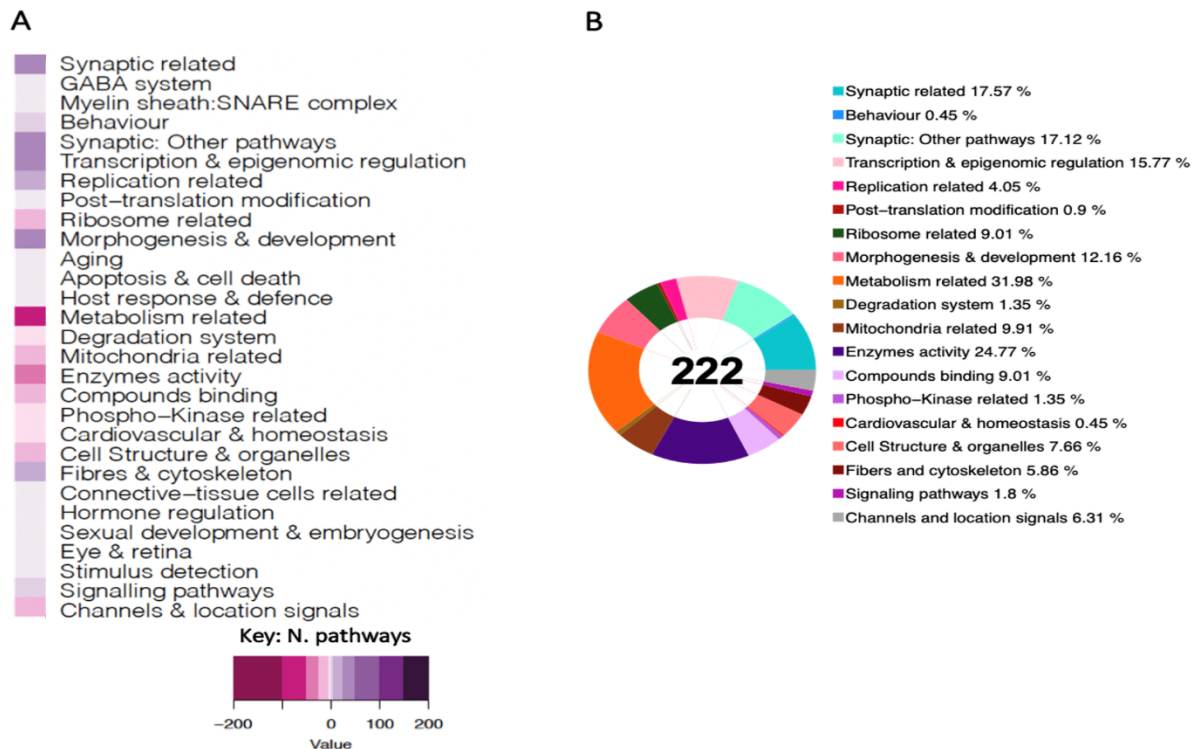


Figure 4: Introducing the adult rat *Del(Dyrk1a)* in the *Dyrk1a* dosage analysis.

(A) Heatmap representation of the number and regulation sense of the pathways altered due to *Dyrk1a* gene dosage in *Del(Dyrk1a)* rats using the genome expression for each model identified by GAGE (Luo et al. 2009) R package and filtered by q-value cut off < 0.1. On the *left* the average number of pathways, on the *right* instead, divided by regulatory sense, only upregulated pathways (purple) and only downregulated (pink). Grouped in the categories shown on the computer such as synaptic related, transcription & epigenomics regulation and replication related. The synaptic related group was divided in 4 subgroups: GABA system, myelin sheath and SNARE complex formation, behavior and others. The color key breaks represent the number of pathways within the categories Breaks (-200,-100,-50,-25,-5,-0.5,+0.5,+5,+25,+50,+100,+150,200). The minus or pink color represents down regulated pathways, the white color represents no pathway found in the category and the purple or positive numbers stands for up regulated pathways respectively. **(B)** Percentage of pathways on each defined group de-regulated on the adult *Del(Dyrk1a)* rat deficit model by RNA-Seq from 222 pathways found altered by GAGE.

Discussion & Conclusion

The following publication is not finalized, indeed we are still missing the analysis' results of the DYRK1A kinase activity assay and the transcriptomic data in the Dup2(*Dyrk1a*) model, as well as the craniofacial study of Del(*Dyrk1a*) and Dup2(*Dyrk1a*) rat models. Therefore, the discussion part of this publication can be found in the "Discussion" part of this thesis manuscript, page 259.

Supplementary information

Table 1: Dup2(*Dyrk1a*) rat generation

5' of <i>Dyrk1a</i>	sgRNA63	F	GTATCACTTAATAGTATCACTTTCA
		R	CACTTATGAACAAGCATCCTGAAGT
	sgRNA69	F	TCAGTTCTGAGAATGCAGCACTTGAG
		R	AGCTATTGTCTCATCCTACAGAGG
3' of <i>Dyrk1a</i>	sgRNA81	F	GACAGCAAGAAGATGAGAGTCAGG
		R	GGTCACAGCACGGCTGAGGAAGTGA
	sgRN187	F	TCTCCATCGATAAATAACCAATGCC
		R	CACGCTCAATAGCTTTGCTTTGGGTG

Table 2: Primers and probes used for quantification of gene copy number

	Forward primers	Reverse primers	Probes
<i>Dyrk1a</i>	CGC AGC GTA AGT ATA ACA TTC AA	TGT GTC TAA TAC ATG ACA CAG TCA GAA	UNIVERSAL PROBE LIBRARY #4*
	TGT CAC AAT GCT ACC CCT ACA	GAG CTT CAG TGC CTG ACC A	Universal Probe Library #82*
	ACT GTC GCT CTC TGC AAT TAG	GAG AGA TGG CTC AGT GGT TAA G	/5HEX/TGTGGTCCT/Zen/ GGGAATTGAACTCAGG/3IABkFQ/
	GAC AGC AAG AAG ATG AGA GTC AGG	CCT CTG TAG GAT GAG ACA ATA GCT	/56-FAM/GGTCACAGC/ZEN/ ACGGCTGAGGAAGTGA/ 3IABKfQ/

*: UPL are short hydrolysis probes (labelled at 5' end with fluorescein (FAM) and at the 3' end with a dark quencher dye) with some nucleotides modified with Locked Nucleic Acids (LNA) technique. UPL probes can be ordered at <https://lifescience.roche.com/>

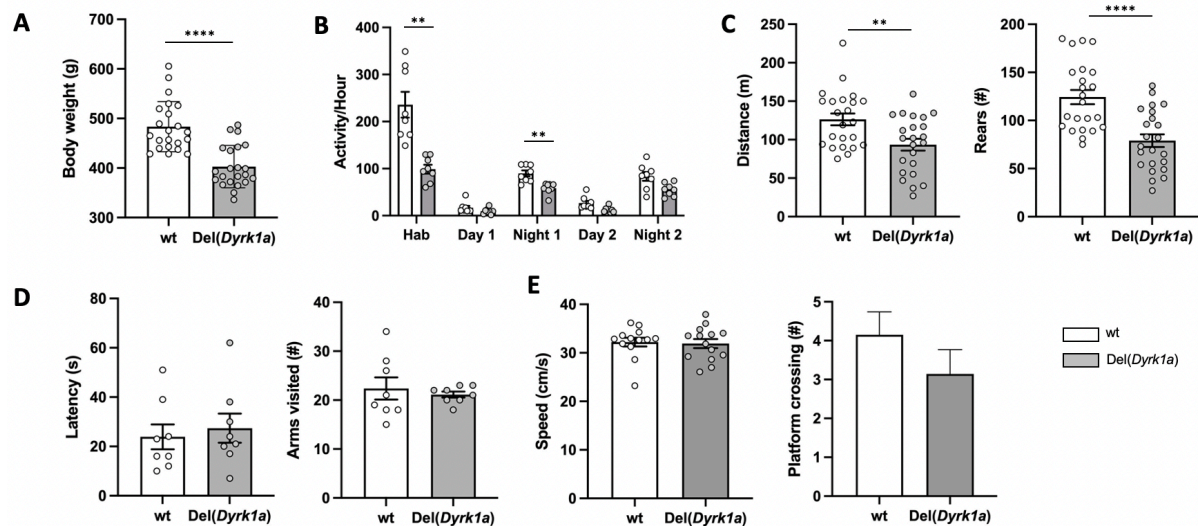


Figure 1: Further *Del(Dyrk1a)* rat line behavioural phenotyping and body weight.

Del(Dyrk1a) rats represented in grey and disomic control rats are in white. **(A)** Body weight. The body mass of *Del(Dyrk1a)* is significantly lower than controls (Student *t*-test, **** $p < 0.0001$, $n = 22$ per group). **(B)** Locomotor activity per hour during different session of circadian activity test. Data showed a decrease of activity in *Del(Dyrk1a)* rats during the habituation and first nocturnal phase (two-way ANOVA: $F_{1,14} = 35.41 - p < 0.0001$; Šídák post-hoc: ** $p < 0.01$ control vs *Del(Dyrk1a)* during habituation and night 1; $n = 8$ per group). **(C)** Distance travelled (*left*) and number of rears (*right*) during open field. Decrease of total distance travelled and number realized by *Del(Dyrk1a)* compare to disomic rats (Student *t*-test: ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$; $n = 23$ per group). **(D)** First arm exit latency (*left*) and number of visited arms (*right*) during Y-maze. No significant difference between the two groups was demonstrated ($n = 8$ per group). **(E)** Swimming speed to reach the platform (*left*) and number of platform crossing (*right*) during the probe test of MWM. No significant differences are noted between control and *Del(Dyrk1a)* rats for either parameters. Results are presented as the mean \pm SEM of the swimming speed (*left*) and the number of platform crossing (*right*).

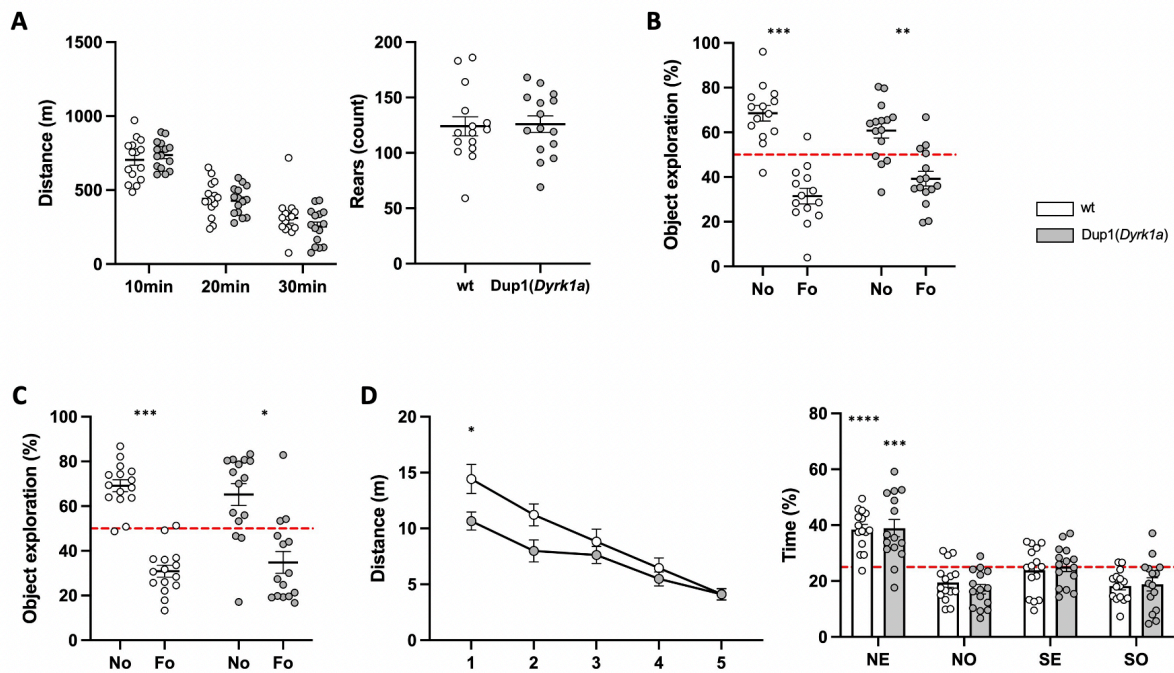


Figure 2: Dup1(Dyrk1a) rat line behavioural phenotyping

Grey and white represent respectively Dup1(Dyrk1a) and disomic control rats. **(A)** Distance travelled in a new environment by increments of 10 minutes (*left*) and number of rears during the 30 min session (*right*) in the Open field area. Results do not indicate any difference of distance travelled and number of rears between the two groups (two-way ANOVA, $F_{2,84}=1.072$ and Student *t*-test, $n=15$ per group). **(B)** Novel Object Recognition test with 1 hour of retention and two objects. Results are presented as percentage of exploration time of the Novel object (No) and Familiar object (Fo). One sample *t*-test vs 50% (hazard) indicated Dup1(Dyrk1a) rats like controls discriminate the No from the Fo (** $p<0.01$, *** $p<0.001$, $n=15$ per group). **(C)** Novel Object Recognition test with 24 hours of retention and two objects. Results are presented as percentage of exploration time of the No and Fo. One sample *t*-test vs 50% (hazard) showed Dup1(Dyrk1a) like controls performed in the test (* $p<0.05$, *** $p<0.001$, $n=15$ per group). **(D)** Distance travelled during the five days of acquisition session (*left*) and time spend in the different quadrant during probe test session (*right*) in MWM. Results are presented as the mean of the distance travelled during the each of the 5 days of acquisition (*left*) and in percentage of time spend in the target quadrant (*right*) during the probe test. Results show that Dup1(Dyrk1a) rats traveled more distance to reach the platform compared to controls during the first day of acquisition, but they caught up distance travelled by controls and reached the platform as fast as the controls for the rest of acquisition phase (two-way

ANOVA, $F_{1,28}=6.784$, * $p<0.05$; $n=15$ per group). One sample t -test vs 25% (hazard) show controls and Dup1(*Dyrk1a*) rats spend more time in the Nord-Est target quadrant (** $p<0.01$, **** $p<0.0001$, $n=15$ per group).

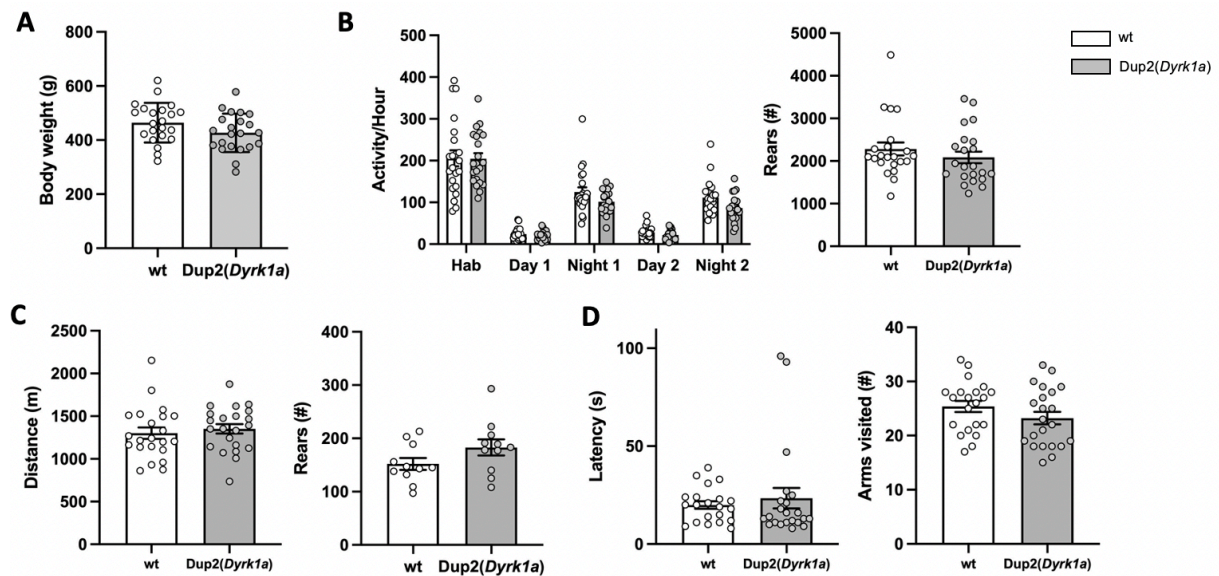


Figure 3: Further Dup2(*Dyrk1a*) rat line behavioural phenotyping and body weight

Dup2(*Dyrk1a*) and disomic rats are represented respectively by grey and white color. **(A)** Body weight. The body mass of Dup2(*Dyrk1a*) is not significantly different than controls (Student t -test, $n=22$ per group). **(B)** Locomotor activity per hour during different session of circadian activity test (*left*) and number of rears realized (*right*). Data do not indicate any significant difference between genotype (two-way ANOVA: $F_{1,42}=2.021$; $n=22$ per group). **(C)** Total distance travelled (*left*) and rears number (*right*) in OF. No difference of the two parameters is observed between Dup2(*Dyrk1a*) and control rats ($n=22$ per group). **(D)** Swimming speed to reach the platform (*left*) and number of platform crossing (*right*) during the probe test of MWM. No significant differences are noted between control and Dup2(*Dyrk1a*) rats for either parameter.

Projet II : Étude de nouveaux inhibiteurs de la kinase DYRK1A sur des modèles de rongeurs du syndrome de Down.

L'objectif de ce projet a été l'investigation de nouveaux inhibiteurs de DYRK1A sur des modèles souris et rats du SD. Ces inhibiteurs sont des dérivés de la L41 dont l'efficacité a déjà été démontrée sur les modèles du SD, comme détaillé dans la publication « *New rat models with duplication and deletion of Dyrk1a for assessment of Down and MRD7 syndromes.* » page 149. Les inhibiteurs de DYRK1A testés sont des Leucettinibs dont l'EMD10, l'EMD92 ainsi que l'EMD173. L'impact de ces Leucettinibs a été étudié sur les capacités d'apprentissage et de mémoire de nos modèles du SD.

Pour ce projet, six études ont été réalisées (**Figure 32**). Les cinq premières études ont été menées sur le modèle souris Tg(*Dyrk1a*) ayant 3 copies de *Dyrk1a* seul, et le modèle souris Dp1Yey, porteur d'une trisomie de 22.9 Mb couvrant toute la région de syntenie entre le chromosome Hsa21 et le chromosome Mmu16. La dernière étude pharmacologique a été effectuée chez les modèles rats Dup(Rno11)-APP^{H3} et Dup(Rno11-20)-APP^{H3}, présentant respectivement une T21 partielle et une T21 complète. Chez les modèles souris, l'impact des Leucettinibs sur la mémoire de travail, la mémoire spatiale ainsi que la mémoire de reconnaissance a été évalué. L'effet du traitement chez les modèles rats a été mesuré sur leurs compétences d'apprentissage et de mémoire spatiale à long terme. Dans le cadre de certaines de ces études, l'impact du traitement aux Leucettinibs au niveau moléculaire a été évalué en quantifiant le niveau de phosphorylation de TAU en Ser202/Thr205 médié par DYRK1A dans l'hippocampe, en réalisant le dosage de l'activité kinase de DYRK1A ou encore en étudiant l'activité du kinome dans les extraits protéiques provenant de demi-cerveaux. Sur l'une des études chez le modèle souris Dp1Yey, des IRMf ont été réalisées en collaboration avec l'équipe du Dr. Laura Harsan (laboratoire iCUBE) dans le but d'étudier l'impact des inhibiteurs de DYRK1A sur l'activité cérébrale des animaux.

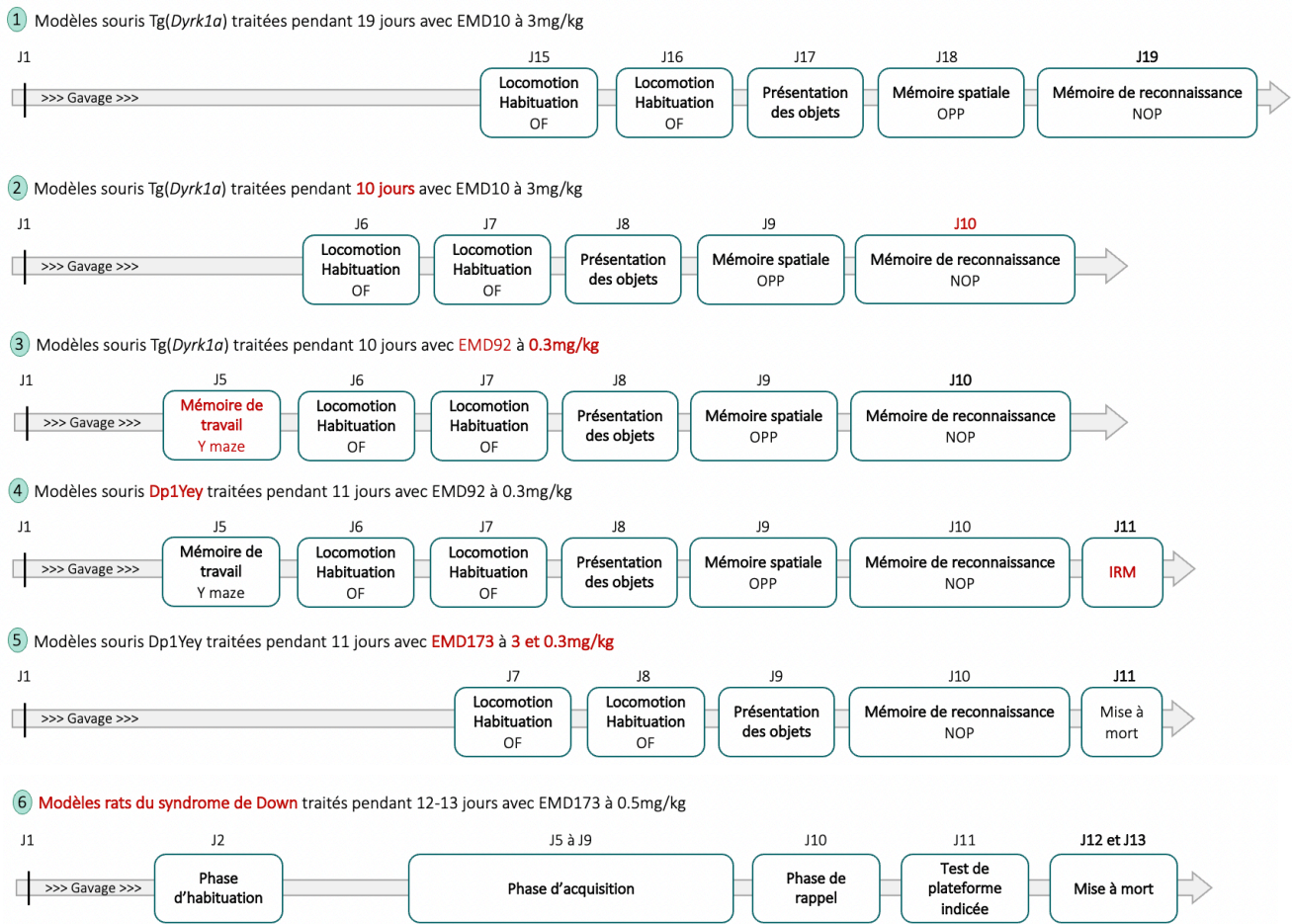


Figure 32 : Synthèse des six études d'inhibiteurs de DYRK1A effectuées sur les modèles rongeurs du SD.

Au cours de ce projet, 6 études d'inhibiteurs de DYRK1A ont été effectuées sur les modèles souris et rats du SD. Au cours de la première étude, les souris Tg(*Dyrk1a*) ont été traitées avec l'EMD10 à une dose de 3 mg/kg pendant 19 jours (noté J). À partir du 15^{ème} jour de traitement, les tests comportementaux débutent en parallèle du traitement avec deux jours consécutifs de test du champ ouvert (OF). Le 17^{ème} jour correspond à la phase de présentation des objets. Les tests OPP et NOP sont respectivement réalisés au 18^{ème} et 19^{ème} jour. La seconde étude est identique à la première, mais la durée du traitement a été effectuée sur 10 jours. Pour la troisième étude, l'EMD92 a été testée sur le modèle souris Tg(*Dyrk1a*) à une dose de 0.3 mg/kg et le test du labyrinthe en Y, en anglais « *Y maze* », a été ajouté au 5^{ème} jour de traitement. La quatrième étude a été effectuée sur le modèle souris Dp1Yey sur 11 jours de traitements avec une analyse d'IRMf au dernier jour. L'EMD173 a été testée sur le modèle Dp1Yey pendant 11 jours à deux doses de traitement (3 et 0.3 mg/kg) au cours de la cinquième étude et seul les tests de l'OF et du NOP ont été utilisés. Pour la dernière étude, les modèles rats du SD ont été

traités avec l'EMD173 durant 12 à 13 jours. Le test de la piscine de Morris débute au 2^{ème} jour de traitement avec la phase d'habituation. Au 5^{ème} jour de l'étude commence la phase d'acquisition du test qui est réalisée sur 5 jours consécutifs. Le test de rappel est réalisé le lendemain du dernier jour d'acquisition. Le test de la piscine de Morris se termine au 11^{ème} jour de l'étude avec le test de la plateforme indiquée. Les animaux sont mis à mort les deux derniers jours de l'étude.

I. Étude de l'EMD10 sur le modèle Tg(*Dyrk1a*) pendant 19 jours de traitement

La durée du traitement de la première étude réalisée a été adaptée en fonction des résultats de l'étude du Dr. Thu-Lan Nguyen au sein de l'équipe du Dr. Yann Héault : rétablissement des fonctions mnésiques des modèles de souris du SD après un traitement de 19 jours avec la L41 et normalisation de l'activité catalytique de la kinase DYRK1A dans le cerveau des souris traitées (Nguyen et al. 2018). En concordance avec ces précédentes études, le traitement à l'EMD10 a donc été réalisé pendant 19 jours chez le modèle souris Tg(*Dyrk1a*). En revanche, l'EMD10 ayant une meilleure capacité d'inhibition de DYRK1A (IC50 = 20.3 nM), la dose de traitement administré a été fixée par l'équipe du Dr. Laurent Meijer à 3 mg/kg/jour au lieu de la dose de 20 mg/kg/jour de L41 utilisée dans les études du Dr. Thu-Lan Nguyen (Nguyen et al. 2018). Dans le but de déterminer l'impact de ce nouvel inhibiteur de DYRK1A sur les déficits mnésiques observés chez les souris Tg(*Dyrk1a*), les tests de l'OF, de l'OPP ainsi que du NOP ont été réalisés. Le test de l'OF permet d'évaluer l'activité locomotrice et l'anxiété des souris. Ce test correspond aussi à la phase d'habituation pour les tests de l'OPP et du NOP qui permettent respectivement de mesurer la mémoire de position de l'objet et de reconnaissance de l'objet. Ces deux types de mémoires sont altérées chez les souris Tg(*Dyrk1a*), et par conséquent les tests de l'OPP et du NOP ont été sélectionnés afin d'évaluer l'impact des Leucettinibs sur ce modèle (Nguyen et al. 2018; Duchon et al. 2021). La chronologie de l'étude est détaillée dans la **Figure 33**, ci-dessous.

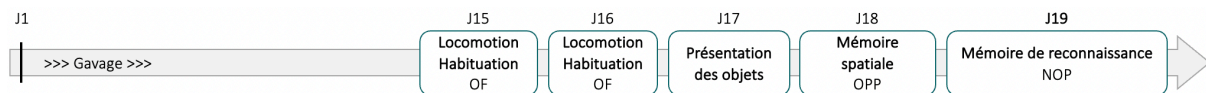


Figure 33 : Chronologie de l'étude de l'EMD10 sur le modèle Tg(*Dyrk1a*) pendant 19 jours de traitements.

Dans cette étude les souris ont été quotidiennement traitées avec l'EMD10 pendant 19 jours (noté J sur la frise chronologique). À partir du 15^{ème} jour de traitement, les tests comportementaux débutent en parallèle du traitement avec deux jours consécutifs de test du champ ouvert (OF). Le 17^{ème} jour correspond à la phase de présentation des objets. Les tests de l'OPP et du NOP sont réalisés respectivement au 18^{ème} et 19^{ème} jour.

1. Effet de l'EMD10 pendant 19 jours de traitement sur les capacités mnésiques des souris Tg(*Dyrk1a*).

L'analyse comportementale débute au 15^{ème} jour de traitement. Les animaux ont été répartis en quatre cohortes et chaque cohorte est constituée de quatre groupes qui se différencient par leur génotype – souris sauvages notées wt, ou les souris Tg(*Dyrk1a*) – et le traitement, souris traitées (T) ou non traitées (NT). Les effectifs par groupe sont les suivants : n = 23 wt NT (dont 12 mâles et 11 femelles), n = 24 wt T (dont 12 mâles et 12 femelles), n = 24 Tg(*Dyrk1a*) NT (dont 12 mâles et 12 femelles) et n = 24 Tg(*Dyrk1a*) T (dont 12 mâles et 12 femelles). Les résultats des tests comportementaux sont présentés dans l'ordre dans lequel ils ont été effectués.

1.1 Activité locomotrice et habituation à l'arène des souris

Le test de champ ouvert (OF) réalisé sur deux jours consécutifs aux jours 15 et 16 de notre protocole correspond à la phase d'habituation des animaux au nouvel environnement pour les tests de l'OPP et du NOP. Ce test permet également d'évaluer l'anxiété et l'activité locomotrice des souris utilisées afin d'étudier la réponse des souris à un nouvel environnement. Ce paramètre peut être impacté par le stress des animaux qui est influencé par la génétique et d'autres facteurs tel que l'administration de certaines drogues. Les souris réalisent un essai de

15 min par jours, durant lesquelles la distance totale parcourue et le temps passé dans les différentes zones du champ ouvert (périphérie et zone) ont été mesurés.

L'ANOVA à trois facteurs (Génotype x Traitement x Sexe) ne montre pas d'effet significatif du sexe sur la distance parcourue au jour 1 et au jour 2 du test (respectivement $F_{1,87}=0.08$ et $F_{1,87}=0.6523$). Les résultats des souris mâles et femelles ont donc été regroupés. L'ANOVA à deux facteurs (Génotype x Traitement) souligne une absence d'effet du génotype ($F_{1,91}=0.7037$ pour le jour 1 et $F_{1,91}=3.373$ pour le jour 2) et un effet du traitement sur la distance parcourue entre les groupes au premier jour et au second jour du test du champ ouvert ($F_{1,91}=12.95 - p<0.001$ pour le jour 1 ; $F_{1,91}=9.518 - p<0.001$ pour le jour 2) (**Figure 34A**). Le test post-hoc révèle que lors du premier jour, le groupe wt T ne parcourt pas significativement plus de distance que le groupe wt NT, ni le groupe Tg(*Dyrk1a*) T vs Tg(*Dyrk1a*) NT. De plus, aucune différence n'est observée entre les groupes wt NT et Tg(*Dyrk1a*) T. Au premier jour du test, l'activité locomotrice n'est donc pas impactée ni par le génotype ni par le traitement. Au deuxième jour, le groupe Tg(*Dyrk1a*) NT est significativement plus actif que le groupe Tg(*Dyrk1a*) T ($p<0.05$ Tg(*Dyrk1a*) T vs Tg(*Dyrk1a*) NT). Un effet du traitement est donc mis en évidence chez les souris Tg(*Dyrk1a*) au deuxième jour du test, avec une diminution de l'activité locomotrice chez les souris Tg(*Dyrk1a*) T. Afin de vérifier l'habituation au nouvel environnement, la distance parcourue pour chacun des groupes au premier jour du test a été comparée à celle du second jour (**Figure 34B**). L'ANOVA à trois facteurs (Génotype x Traitement x Jour) met en évidence un effet du jour pour chacun des groupes ($F_{1,92}=194.0 - p<0.0001$). Ainsi, la distance parcourue par les animaux est diminuée entre le jour 1 et le jour 2 reflétant une habituation au nouvel environnement.

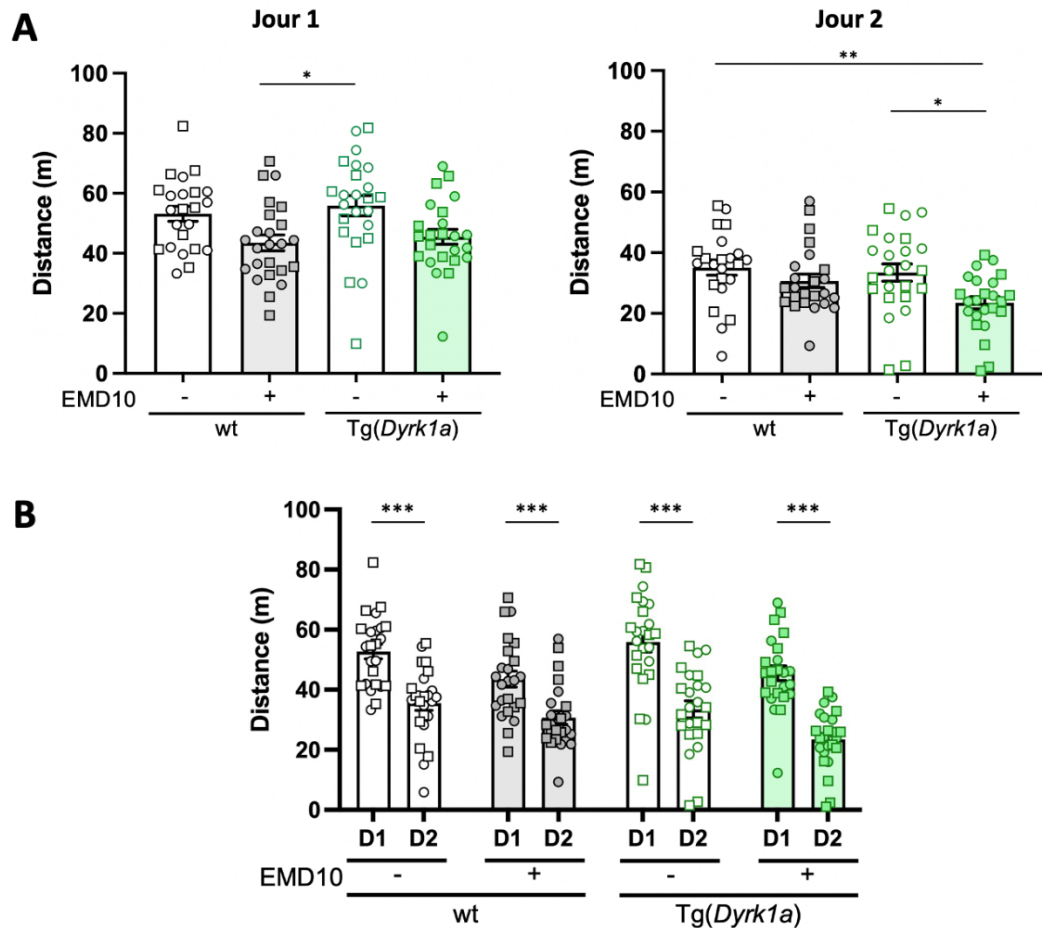


Figure 34 : Distance parcourue dans le test du champ ouvert chez les souris *Tg(Dyrk1a)* traitées avec l'EMD10.

Les cercles et les carrés représentent respectivement les souris mâles et femelles. **(A)** Distance parcourue pendant les deux jours d'habituation. Au jour 1 du test, le groupe *Tg(Dyrk1a)* NT parcourt une plus grande distance que le groupe wt T. Au jour 2, les groupes wt NT et *Tg(Dyrk1a)* NT parcourent plus de distance que le groupe *Tg(Dyrk1a)* T. **(B)** Comparaison des distances parcourues entre le jour 1 et le jour 2. Tous les groupes étudiés parcourent moins de distance le deuxième jour du test que le premier. Les valeurs représentent des moyennes \pm erreur-type. Statistiques : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

1.2 Mémoire de reconnaissance de la position de l'objet

Le test de l'OPP a été utilisé pour mesurer l'effet de l'EMD10 sur la mémoire spatiale des souris *Tg(Dyrk1a)*. La mémoire évaluée dans ce test correspond à la mémoire épisodique chez l'homme, c'est-à-dire la mémoire des événements personnellement vécus avec leur

contexte. Cette mémoire inclue trois composantes permettant de définir le contexte : « où », « quand » et « quoi » (Tulving 1972). Le test de l'OPP permet de mesurer la fonction « où » de la mémoire épisodique (Ennaceur, Neave, et Aggleton 1997). Ce test repose sur le comportement inné des rongeurs à explorer plus longtemps un objet qui a été déplacé par rapport à un objet familier non déplacé. Les souris sont placées dans l'arène en présence de deux objets identiques pendant 14 min, cela correspond à la phase d'encodage de la mémoire dit aussi « phase de présentation ». Le lendemain (24 heures de rétention), les deux objets sont à nouveau présentés aux souris, mais l'un des deux objets est déplacé. Cette seconde phase correspond à la phase de récupération de la mémoire dit aussi « phase de test ». Afin d'évaluer la mémoire spatiale des souris, le temps d'exploration de chaque objet est mesuré pendant la phase de test puis rapporté au temps total d'exploration afin d'obtenir le pourcentage de temps d'exploration pour chacun des objets. Le test ayant été réalisé sur un total de 14 min, l'analyse a été effectuée à ce temps, mais aussi à 10 min afin de comparer les résultats obtenus à ceux de l'étude de la L41 (Nguyen et al. 2018).

Un ANOVA à trois facteurs (Génotype X Traitement X Sexe) a été réalisé afin d'étudier l'effet du sexe sur le pourcentage d'exploration de l'objet déplacé au cours de la phase de test. Aucun effet du sexe n'ayant été observé ($F_{1,87}=3.747$ à 10 min ; $F_{1,87}=0.4330$ à 14 min), les résultats des mâles et des femelles ont été regroupés (**Figure 35**). L'ANOVA à deux facteurs (Génotype x Traitement) sur le pourcentage d'exploration du nouvel objet ne révèle pas d'effet significatif du génotype à 10 et 14 min ($F_{1,91}=1.439$ à 10 min ; $F_{1,91}=0.2132$ à 14 min), ni du traitement à 10 min ($F_{1,91}=0.1767$ à 10 min). Un effet du traitement est observé à 14 min ($F_{1,91}=4.501 - p<0.05$ à 14 min). Le test post-hoc souligne une augmentation du temps d'exploration du nouvel objet chez les souris Tg(*Dyrk1a*) T par rapport au Tg(*Dyrk1a*) NT ($p<0.05$). Le pourcentage de temps d'exploration des différents objets a ensuite été comparé à une exploration au hasard (correspondant à la valeur de 50%) avec le One sample *t*-test. Ainsi, les animaux contrôles (wt NT et T) passent significativement plus de 50% de leur temps à explorer l'objet déplacé ($p<0.01$ et $p<0.05$ pour wt NT respectivement à 10 min et 14 min ; $p<0.05$ et $p<0.01$ pour wt T respectivement à 10 et 14 min). Cela n'est pas le cas du groupe Tg(*Dyrk1a*) NT qui présente un déficit de la mémoire de reconnaissance de la position de l'objet. En revanche, les animaux Tg(*Dyrk1a*) T passent significativement plus de 50% du temps sur

l'objet déplacé comme les animaux contrôles, reflétant donc une préservation du souvenir de la position de l'objet ($p < 0.05$ à 10 min et $p < 0.01$ à 14 min).

Les résultats montrent que le traitement à l'EMD10 pendant 19 jours permet de corriger le déficit de mémoire spatiale chez les souris *Tg(Dyrk1a)*.

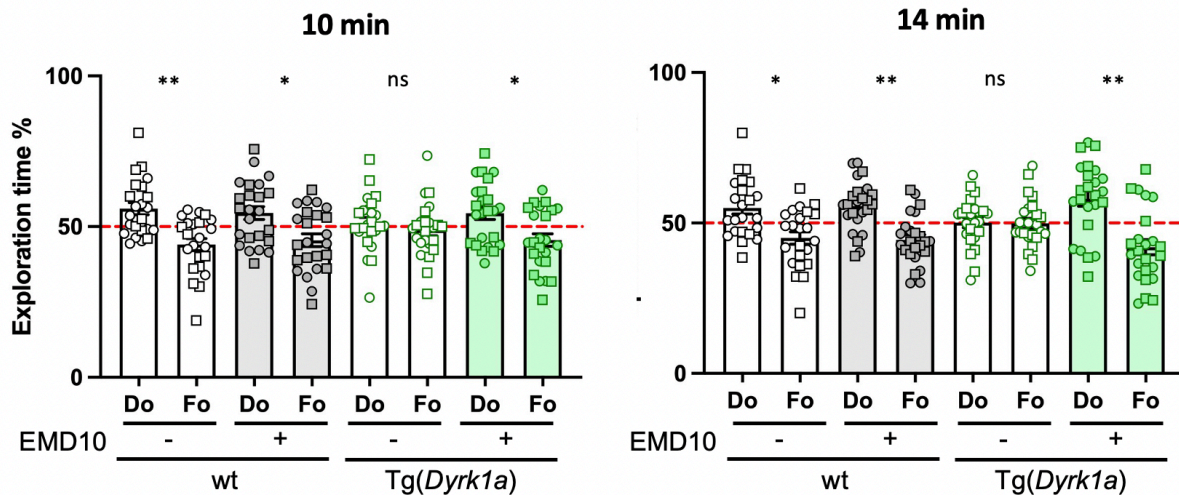


Figure 35 : Effet de l'EMD10 sur la mémoire spatiale des souris *Tg(Dyrk1a)* mesurés dans le test de l'OPP.

L'objet déplacé est noté Do et l'objet familier non déplacé est noté Fo. Dans chaque groupe, les souris mâles sont représentées par des cercles et les femelles par des carrés. Au deux temps (10 et 14 min), un déficit de la mémoire spatiale est relevé chez les souris *Tg(Dyrk1a)* NT alors que le groupe *Tg(Dyrk1a)* T, comme les groupes wt, explorent plus de 50% du temps le Do que le Fo. Les valeurs représentent des moyennes \pm erreur-type. Statistiques : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs hasard (50%) ; ns pour non significatif.

1.3 Mémoire de reconnaissance d'objet

L'effet de l'EMD10 sur la mémoire de reconnaissance chez les souris *Tg(Dyrk1a)* traitées pendant 19 jours a été évalué avec le test du NOP. Comme pour le test de l'OPP, la mémoire mesurée dans le test du NOP correspond à la mémoire épisodique chez l'homme et plus particulièrement à la composante « quoi » (Ennaceur et Delacour 1988). Ce test s'appuie sur le comportement inné des rongeurs à explorer plus longtemps un objet nouveau comparé à un

objet familier. Les souris sont placées dans l'arène en présence de deux objets identiques (les mêmes que pour l'OPP), cela correspond la phase d'encodage de la mémoire, dit aussi « phase de présentation ». Le lendemain, la « phase de test », dit aussi récupération de la mémoire, est réalisée. Au cours de cette phase, l'un des deux objets est remplacé par un nouvel objet. Dans le but d'évaluer la mémoire de reconnaissance des souris, le temps passé à explorer les différents objets est mesuré pendant la phase de test et le pourcentage de temps d'exploration de chaque objet est calculé en rapportant le temps d'exploration d'un objet sur le temps total d'exploration. Comme pour l'OPP, le test du NOP a été réalisé sur un total de 14 min, l'analyse a donc été effectuée à ce temps, mais aussi à 10 min afin de comparer les résultats obtenus à ceux de l'étude de la L41 (Nguyen et al. 2018).

Un ANOVA à trois facteurs (Génotype X Traitement X Sexe) a été réalisé pour analyser l'effet du sexe sur le pourcentage d'exploration de l'objet nouveau. Aucun effet du sexe n'ayant été observé ($F_{1,87}=0.5661$), les résultats des mâles et des femelles ont été regroupés (**Figure 36**). De plus, l'analyse statistique de l'ANOVA à trois facteurs (Génotype x Traitement x Sexe) ne révèle pas d'effet du traitement à 10 et 14 min ($F_{1,91}=0.5382$ à 10 min ; $F_{1,91}=2.313$ à 14 min), ni d'effet du génotype à 10 min ($F_{1,91}=3.079$ à 10 min). L'ANOVA à trois facteurs souligne un effet du génotype à 14 min ($F_{1,91}=7.158 - p<0.01$ à 14 min). Le test post-hoc met en évidence une diminution du pourcentage d'exploration de l'objet nouveau chez les souris Tg(*Dyrk1a*) NT par rapport aux souris wt NT ($p<0.001$) et Tg(*Dyrk1a*) T. De plus, la comparaison du pourcentage de temps d'exploration à 50% (hasard) à 10 min et 14 min montre que les animaux contrôles (wt NT et T) passent significativement plus de 50% de leur temps à explorer l'objet nouveau ($p<0.0001$ pour wt NT à 10 et 14 min ; $p<0.001$ et $p<0.01$ pour wt T respectivement à 10 et 14 min). Cela n'est pas le cas des souris Tg(*Dyrk1a*) NT qui présentent un déficit de leur mémoire de reconnaissance. En revanche, les animaux Tg(*Dyrk1a*) T passent significativement plus de 50% du temps sur l'objet nouveau ($p<0.0001$ à 10 min ; $p<0.001$ à 14 min).

Les résultats mettent en évidence que le traitement à l'EMD10 pendant 19 jours permet le rétablissement de la mémoire de reconnaissance des souris Tg(*Dyrk1a*).

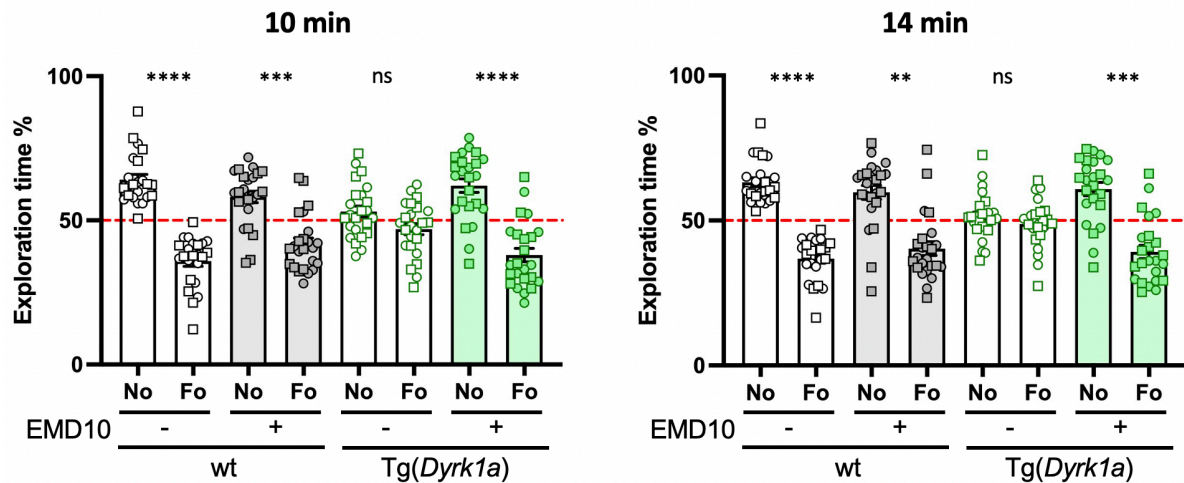


Figure 36 : Effet de l'EMD10 sur la mémoire de reconnaissance des souris *Tg(Dyrk1a)* mesurée dans le test du NOP.

L'objet nouveau est noté No et l'objet familier est noté Fo. Dans chaque groupe, les souris mâles sont représentées par des cercles et les femelles par des carrés. Pour l'analyse aux deux temps (10 et 14 min), un déficit de la mémoire de reconnaissance d'objet est observé chez les souris *Tg(Dyrk1a)* NT alors que le groupe *Tg(Dyrk1a)* T, comme les groupes wt, explorent plus de 50% du temps le No plutôt que le Fo. Les valeurs représentent des moyennes \pm erreur-type. Statistiques : ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs hasard (50%) ; ns pour non significatif.

2. Effet de l'EMD10 pendant 19 jours de traitements sur l'activité kinase de DYRK1A chez les souris *Tg(Dyrk1a)*

L'impact de 19 jours de traitement avec l'EMD10 sur l'activité catalytique de DYRK1A a été mesuré de différentes manières : dosage de l'activité catalytique de DYRK1A, quantification de phosphorylation d'un site connu de DYRK1A et analyse de l'activité du kinome. L'étude de l'activité du kinome permet de vérifier l'activité de DYRK1A mais aussi d'analyser le profil d'activité des autres kinases présentes dans les extraits protéiques des souris wt NT et T, ainsi que *Tg(Dyrk1a)* NT et T.

2.1 Activité kinase de DYRK1A

Le dosage de l'activité de DYRK1A a été réalisé sur des extraits protéiques de demi-cerveaux de souris contrôles (wt NT n=8, wt T n=8) et Tg(*Dyrk1a*) (NT n=8 et T n=8). Tous les dosages d'activité kinase de DYRK1A, basés sur la séparation et la quantification de peptides fluorescents spécifiques (substrat et produit phosphorylé) par HPLC, ont été réalisés par le Dr. Julien Dairou (Paris, France).

L'ANOVA à deux facteurs (Génotype x Traitement) met en évidence un effet du traitement sur l'activité kinase de DYRK1A ($F_{1,28}=25.45 - p<0.0001$). Ainsi le test post-hoc montre une diminution de l'activité de DYRK1A dans le groupe wt T par rapport aux groupes wt NT ($p<0.01$) et Tg(*Dyrk1a*) NT ($p<0.001$) (**Figure 37**). De plus, l'activité kinase de DYRK1A est réduite suite au traitement des souris Tg(*Dyrk1a*) avec l'EMD10 par rapport aux souris Tg(*Dyrk1a*) NT ($p<0.01$). Cependant, aucune augmentation de l'activité kinase de DYRK1A n'est observée chez les souris Tg(*Dyrk1a*) NT par rapport aux souris wt NT.

Dix-neufs jours de traitement avec l'EMD10 permet une diminution de l'activité kinase de DYRK1A chez les souris Tg(*Dyrk1a*) traitées. Cependant, le traitement induit aussi une diminution de l'activité de DYRK1A chez les souris wt et l'activité de DYRK1A n'est pas augmentée chez les souris Tg(*Dyrk1a*) non traitées. Ces résultats sont contradictoires aux travaux de la L41 réalisés sur les souris Tg(*Dyrk1a*) qui révèlent une augmentation de l'activité de DYRK1A chez ces dernières avec une normalisation de l'activité suite au traitement à la L41 et sans effet sur les animaux sauvages.

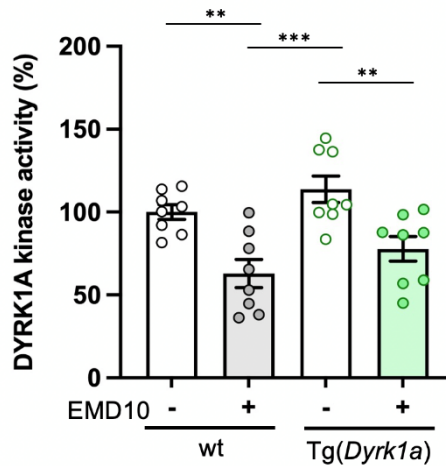


Figure 37 : Effet de l'EMD10 sur l'activité kinase de DYRK1A dans les extraits de cerveaux des souris Tg(*Dyrk1a*) traitées pendant 19 jours.

L'activité kinase de DYRK1A dans les groupes wt T est diminuée par rapport aux groupes wt NT et Tg(*Dyrk1a*) NT. L'administration de l'EMD10 permet de réduire l'activité catalytique de DYRK1A chez les souris Tg(*Dyrk1a*). Les valeurs représentent des moyennes \pm erreur-type. Statistiques : ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

2.2 Phosphorylation de TAU, une cible de DYRK1A

TAU est une protéine impliquée dans la stabilisation des microtubules, connue pour être phosphorylée par DYRK1A sur de nombreux résidus dont la Ser202 et la Thr205 (Liu et al. 2008). La phosphorylation de ces deux résidus a été mesurée dans les extraits protéiques d'hippocampe – région impliquée dans les processus de mémoire – des souris afin d'évaluer l'impact de l'EMD10 sur l'activité kinase de DYRK1A. La quantification du niveau de phosphorylation a été effectuée sur les extraits des souris contrôles et Tg(*Dyrk1a*) NT ou T. Les effectifs sont les suivants : $n = 8$ wt NT, $n = 8$ wt T, $n = 7$ Tg(*Dyrk1a*) NT et $n = 8$ Tg(*Dyrk1a*) T.

L'ANOVA à deux facteurs (Génotype x Traitement) met en évidence un effet du génotype ($F_{1,27}=4.393 - p < 0.05$) et de l'interaction Génotype x Traitement ($F_{1,27}=9.372 - p < 0.01$) sur le niveau de phosphorylation de la protéine TAU (**Figure 38**). En effet, comme attendue, une augmentation de l'activité de DYRK1A chez les souris Tg(*Dyrk1a*) NT est observée en comparaison aux souris wt NT ($p < 0.01$). De plus, le niveau de phosphorylation de la protéine TAU est diminué chez les souris Tg(*Dyrk1a*) T en comparaison aux souris Tg(*Dyrk1a*) NT ($p < 0.05$)

et revient à un niveau similaire au groupe wt NT, reflétant une normalisation de la phosphorylation de TAU en Ser202/Thr205 chez les souris transgénique pour le gène *Dyrk1a* traitées pendant 19 jours avec l'EMD10 ($p=0.9934$). Enfin, aucun effet du traitement n'est observé sur le niveau de phosphorylation de TAU en Ser202/Thr205 chez les souris wt T par rapport aux souris wt NT.

L'EMD10 permet de normaliser l'activité kinase de DYRK1A sur le niveau de phosphorylation de la protéine Tau en Ser202/Thr205 dans l'hippocampe des souris Tg(*Dyrk1a*) traitées pendant 19 jours.

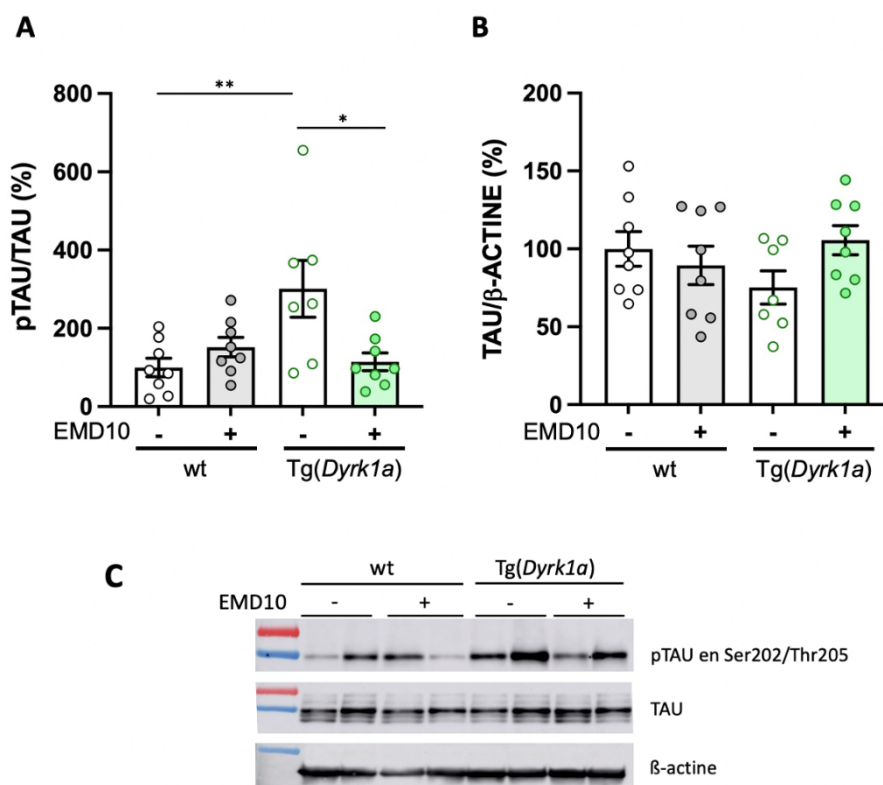


Figure 38 : Phosphorylation de TAU en Ser202/Thr205 dans l'hippocampe des souris Tg(*Dyrk1a*) traitées avec l'EMD10.

(A) Expression relative de la phosphorylation de TAU en Ser202/Thr205 en pourcentage. Une diminution du niveau de phosphorylation de TAU est observée dans l'hippocampe des souris Tg(*Dyrk1a*) T par rapport aux souris Tg(*Dyrk1a*) NT. (B) Expression relative du rapport TAU/β-ACTINE en pourcentage. Aucune différence n'est observée entre les groupes. (C) Images des western blot. Les valeurs représentent des moyennes ± erreur-type. Statistiques : * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

2.3 Profil d'activité du kinome

La technologie micropuce peptidique PamChip permet d'analyser l'effet de 19 jours de traitement avec l'EMD10 sur l'activité des kinases dans les extraits protéiques des souris. Les échantillons ont été incubés sur une puce STK (« *serine-threonine kinase* ») constituée de 144 séquences peptidiques phosphorylées par des sérine/thréonine kinases, les séquences peptidiques sont nommées ci-après phosphosites. Les kinases présentes dans les lysats phosphorylent les phosphosites, qui sont visualisés à l'aide d'anticorps marqués par fluorescence. Toutes les analyses du profil d'activité du kinome ont été réalisées par Valérie Calco (Plate-forme de Chimie Biologique Intégrative de Strasbourg, France, Illkirch) et le Dr. Savithri Rangarajan (PamGene, Pays-Bas, Bois-le-Duc) sur les mêmes extraits protéiques utilisés pour la mesure d'activité kinase de DYRK1A. Les effectifs sont : n = 6 par groupe (wt NT, wt T, Tg(*Dyrk1a*) NT et Tg(*Dyrk1a*) T).

L'analyse des résultats a été réalisée en comparant spécifiquement l'activité de DYRK1A dans les différents groupes (**Figure 39**). Pour cela, le score final médian de la kinase DYRK1A a été calculé dans ces groupes. Ce score médian de DYRK1A est basé sur un score de sensibilité (différence entre les groupes) et un score de spécificité (les peptides ciblés par DYRK1A sont identifiés à partir des bases de données actuelles). Le score final médian correspond au classement de la kinase DYRK1A dans l'analyse d'UKA (« *Upstream kinase analysis* »), c'est-à-dire le classement des kinases dont l'activité est la plus modifiée d'un groupe à l'autre. Seules les comparaisons Tg(*Dyrk1a*) NT vs wt NT et Tg(*Dyrk1a*) T vs Tg(*Dyrk1a*) NT ont dépassé le seuil de fiabilité (> 1.2) et sont représentées dans la **Figure 39A**. La statistique de la kinase DYRK1A indique les différences entre les groupes, avec la taille de l'effet (valeurs) et la direction (+ ou > 0 = activation ; - ou 0 = inhibition). Comme cela était attendu, on observe une augmentation de l'activité kinase de DYRK1A chez les souris Tg(*Dyrk1a*) NT par rapport aux souris wt NT (**Figure 39B**). En revanche, une diminution de l'activité de DYRK1A est observée chez les souris Tg(*Dyrk1a*) T en comparaison aux souris Tg(*Dyrk1a*) NT, reflétant une normalisation de l'activité de DYRK1A grâce à l'administration d'EMD10 chez les souris Tg(*Dyrk1a*).

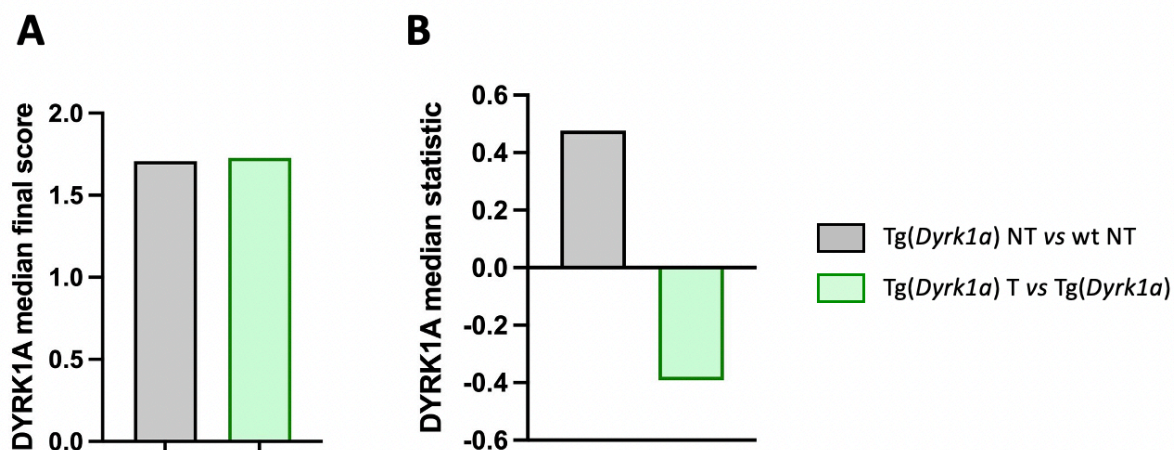


Figure 39 : Représentation de la statistique de la kinase DYRK1A et de la médiane de son score final dans les différents groupes wt ainsi que Tg(*Dyrk1a*) NT et T.

(A) La médiane du score finale de DYRK1A fait référence à son classement dans l'analyse d'UKA. Uniquement les comparaisons Tg(*Dyrk1a*) NT vs wt NT et Tg(*Dyrk1a*) T vs Tg(*Dyrk1a*) NT ont dépassé le seuil de fiabilité (> 1.2). (B) La médiane de la statistique de la kinase DYRK1A correspond à la différence entre deux groupes (valeurs et sens). Une augmentation de l'activité de DYRK1A est observée chez les souris Tg(*Dyrk1a*) NT vs les souris wt NT. En revanche, une diminution de l'activité de DYRK1A est soulignée dans les extraits des souris Tg(*Dyrk1a*) T par rapport à ceux des souris Tg(*Dyrk1a*) NT. Les histogrammes représentent une unique valeur par comparaison.

Par ailleurs, la technologie système PamChip permet aussi l'analyse du profil d'activité des autres kinases des extraits de demi-cerveaux. Les variations d'activité des kinases entre les différents groupes ont été sélectionnées au-dessus du seuil de 1.2 du score final médian, comme pour DYRK1A. À partir de cela, des arbres phylogénétiques ont été générés afin de regrouper les kinases par famille et de montrer les variations du kinome. Il est important de souligner que la **Figure 40** montre les résultats de la comparaison du profil du kinome des souris wt NT par rapport aux souris T, par conséquent une coloration bleue correspondant à une régulation à la baisse qui signifie en réalité à une régulation à la hausse due au traitement chez souris sauvages. Dans un premier temps, nous pouvons remarquer que DYRK1A ne passe pas le seuil et n'est donc pas détectée. Dans un second temps, quelques variations de l'activité

d'autres kinases sont observées chez les souris wt NT par rapport aux souris T. En effet, le traitement avec l'EMD10 chez les souris sauvages induit une diminution de l'activité de 11 kinases dont : 2 kinases SGK ; GSK3 α et β de la famille des CMGC ; NUAk1, MSK1-B et RSK2-B de la famille des CAMK ; MSK1, RSKL1 et RSK2 de la famille AGC ; ainsi que VRK1 de la famille de CK1. Chez les souris sauvages, l'EMD10 induit également une augmentation de l'activité de 23 kinases ci-après : TAK1 de la famille des TKL ; ANP α de la famille des TK, 11 kinases de la famille des CMGC tels que ERK1 et ERK7 ainsi que CDC2/CDK1 et CDK2 ; 4 kinases de la famille des AGC tels que ROCK1 et ROCK2 ; MAPKAPK2 et MAPKAPK3 de la famille des CAMK et 3 kinases de la famille des STE. Ces résultats mettent en évidence un effet du traitement de l'EMD10 sur l'ensemble du kinome des souris sauvages et non uniquement sur l'activité kinase de DYRK1A.

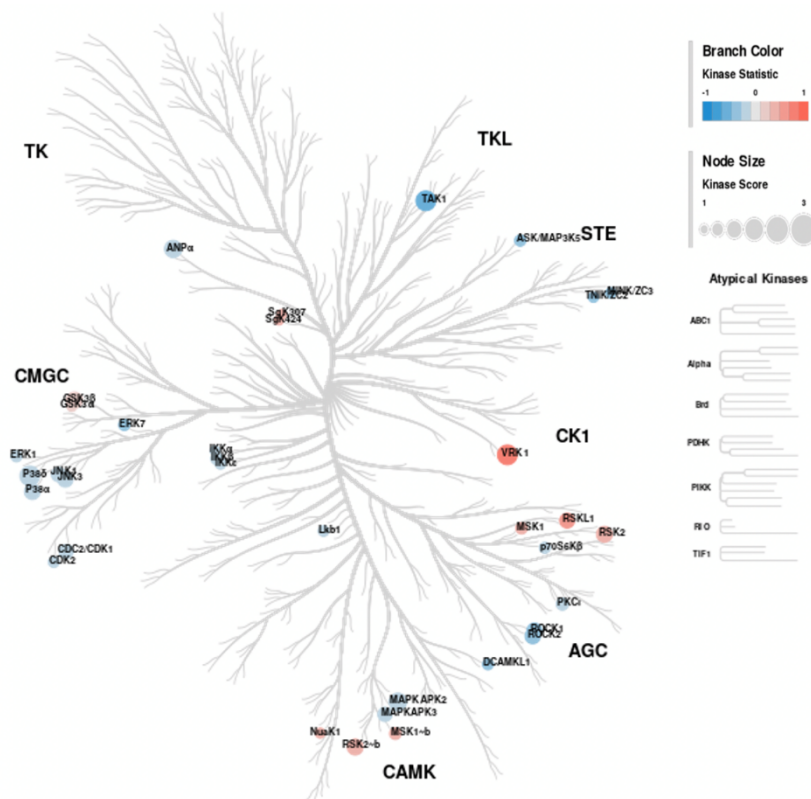


Figure 40 : Profil d'activité du kinome chez les souris wt NT en comparaison aux souris wt T.

La coloration indique la taille et la direction de l'effet (bleu : diminution de l'activité de la kinase ; et rouge : augmentation de l'activité de la kinase), et la taille du cercle indique le score de spécificité de la kinase, c'est-à-dire le classement de la kinase dans l'analyse d'activité des kinases les plus modifiées d'un groupe à l'autre. L'activité kinase de DYRK1A est en dessous du seuil de fiabilité (>1.2) dans la comparaison wt NT vs wt T.

Concernant l'analyse du profil du kinome des souris Tg(*Dyrk1a*) NT par rapport aux souris contrôles wt NT, une augmentation de l'activité de DYRK1A est bien observée sur l'arbre phylogénétique (**Figure 41**). La trisomie unique du gène *Dyrk1a* conduit à une perturbation de l'activité de nombreuses autres kinases que DYRK1A. En effet, une augmentation de l'activité de 9 kinases est observée, ci-après : TBK1 de la famille des CMGC ; DAPK3, NUAk1, MSK1-B et RSK2-B de la famille des CAMK ; MSK1 et RSK2 de la famille des AGC ; VRK1 de la famille des CK1. De plus, une diminution de l'activité de nombreuses kinases (un total de 32) est observée chez les souris Tg(*Dyrk1a*) en comparaison aux souris contrôles : 7 kinases de la famille CMCG dont ERK1 et CDC2/CDK1 ; 7 kinases de la famille des CAMK dont MAPKAPK2 et DCAMKL1 ; 8 des AGC dont ROCK1 ou encore; CK1alpha de la famille CK1 ; 4 kinases de la famille STE ; 4 kinases de la famille TKL dont BRAF ainsi que l'ANP α . Ces résultats mettent en évidence une perturbation de l'activité de l'ensemble du kinome par la seule trisomie du gène *Dyrk1a* chez le modèle souris.

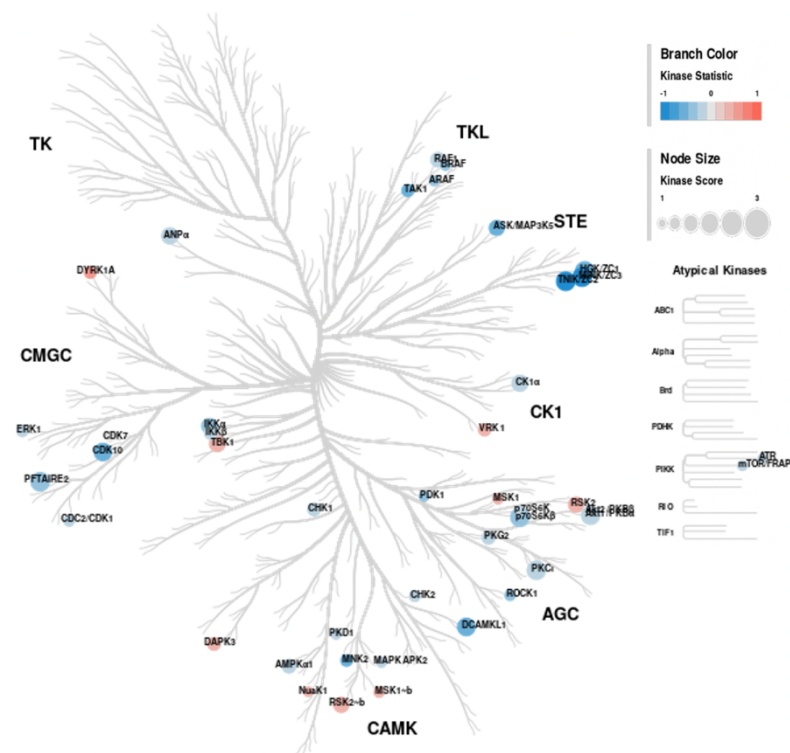


Figure 41 : Profil d'activité du kinome chez les souris Tg(*Dyrk1a*) NT en comparaison aux souris wt NT.

La coloration indique la taille et la direction de l'effet (bleu : diminution de l'activité de la kinase ; et rouge : augmentation de l'activité de la kinase), et la taille du cercle indique le score de spécificité de la kinase, c'est-à-dire le classement de la kinase dans l'analyse d'activité des kinases les plus modifiées d'un groupe à l'autre. L'activité de DYRK1A est augmentée dans chez le souris Tg(*Dyrk1a*) NT par rapport aux souris contrôles.

S'agissant de l'analyse d'activité du kinome chez les souris Tg(*Dyrk1a*) T vs wt NT, l'activité de DYRK1A se situe en dessous du seuil fixé comme dans la comparaison wt T vs wt NT (**Figure 42**). Cela suggère que l'activité de DYRK1A est la même dans les groupes Tg(*Dyrk1a*) T et wt NT. De plus, seulement trois kinases sont régulées à la hausse chez les Tg(*Dyrk1a*) T par rapport aux souris contrôles NT : PKN1/PRK1 de la famille des AGC, TBK1 de la famille des IKK et ATM de la famille des PIKK. TBK1 est une kinase qui est aussi régulée à la hausse chez les souris Tg(*Dyrk1a*) NT, le traitement à l'EMD10 ne régule pas à la baisse l'activité de cette kinase. Un grand nombre d'autres kinases (37) sont sous-régulées chez les souris Tg(*Dyrk1a*) T : ANPα de la famille des TK ; 4 kinases de la famille des TKL dont BRAF ; 5 kinases de la famille STE ; CK1α de la famille des CK1 ; 11 kinases de la famille des AGC dont RSKL2 et RSK3 ; 12 kinases de la famille des CAMK dont RSK1-B ou RSK3-B, MAPKAPK2 ; des IKK kinases ; CDC2/CDK1 de la famille des CMGC ainsi que ADCK3 de la famille ABC1. Ainsi l'inhibition de l'activité de DYRK1A avec un traitement aux Leucettinibs permet d'éliminer la majorité des dérégulations des kinases à la hausse chez les souris Tg(*Dyrk1a*). Mais, il est important de noter que le traitement induit une diminution de l'activité de 20 kinases de la famille des CMGC, CAMK et AGC chez les souris Tg(*Dyrk1a*) par rapport aux souris contrôles NT. Ces kinases sont impliquées dans de nombreux processus biologique de l'organisme. Par exemple, les kinases ERK participent à la cascade de transduction du signal RAS-RAF-MEK-ERK, régulant des processus biologiques tels que l'adhésion cellulaire, la progression du cycle cellulaire, la migration cellulaire, la survie cellulaire, la différenciation, le métabolisme, la prolifération et la transcription (Roskoski 2012). Par conséquent, il est important de réaliser des études futures afin de vérifier l'impact de cette diminution d'activité du kinome.

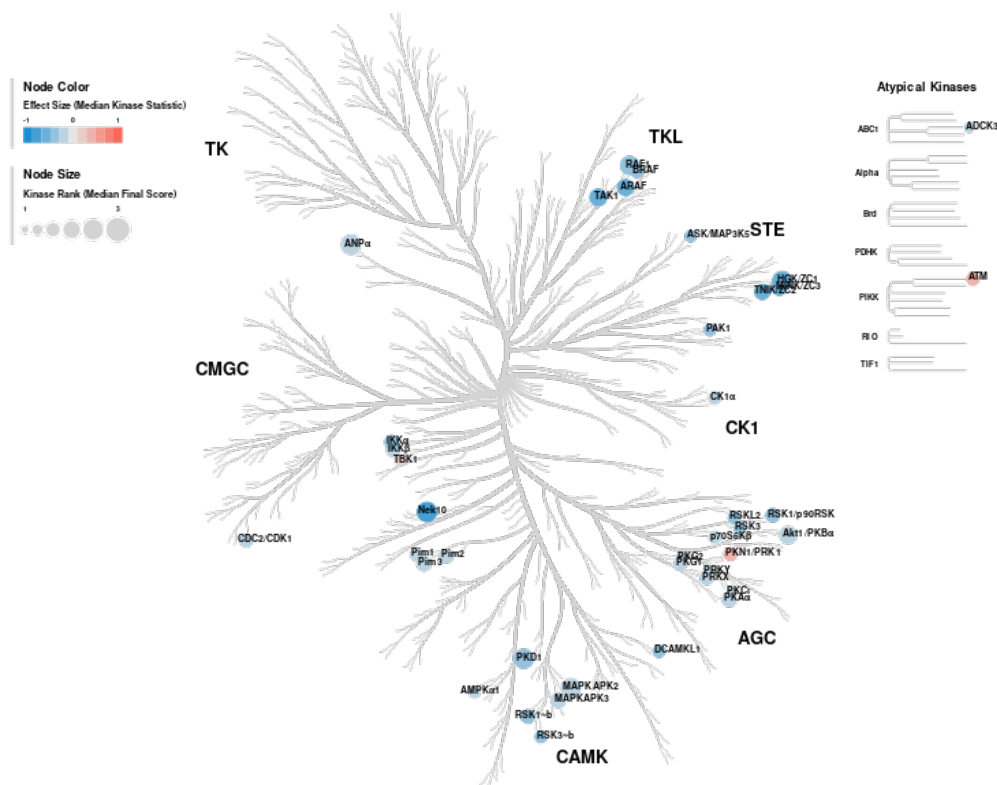


Figure 42 : Profil d'activité du kinome chez les souris Tg(*Dyrk1a*) T en comparaison aux souris wt NT.

La coloration indique la taille et la direction de l'effet (bleu : diminution de l'activité de la kinase ; et rouge : augmentation de l'activité de la kinase), et la taille de cercle indique le score de spécificité de la kinase, c'est-à-dire le classement de la kinase dans l'analyse d'activité des kinases les plus modifiées d'un groupe à l'autre. L'activité kinase de DYRK1A est en dessous du seuil de fiabilité (> 1.2) dans la comparaison Tg(*Dyrk1a*) T vs wt NT. Cela reflète une absence de différence de l'activité catalytique de DYRK1A entre les deux groupes.

Enfin, l'analyse de l'activité du kinome chez les souris Tg(*Dyrk1a*) T par rapport aux souris Tg(*Dyrk1a*) NT révèle une réduction de l'activité catalytique de DYRK1A. L'EMD10 permet donc d'inhiber la kinase DYRK1A chez le souris Tg(*Dyrk1a*) après 19 jours de traitement (**Figure 43**). Par ailleurs, le profil du kinome ne montre aucune kinase régulée à la hausse chez les souris Tg(*Dyrk1a*) T par rapport aux Tg(*Dyrk1a*) NT et un total de 20 kinases sont régulées à la baisse, listés ci-après : 9 kinases de la famille des CMGC dont DYRK1A et ERK1 ; 3 kinases PIM ; DAPK2, RSK1-B et RSK2-B de la famille des CAMK ; PKG1, PKA α , RSK1 et RSK2 de la famille des AGC ainsi

que ADCK3 de la famille ABC1. Le traitement à l'EMD10 chez les souris Tg(*Dyrk1a*), conduit à une diminution du profil l'activité du kinome par rapport aux souris Tg(*Dyrk1a*) NT.

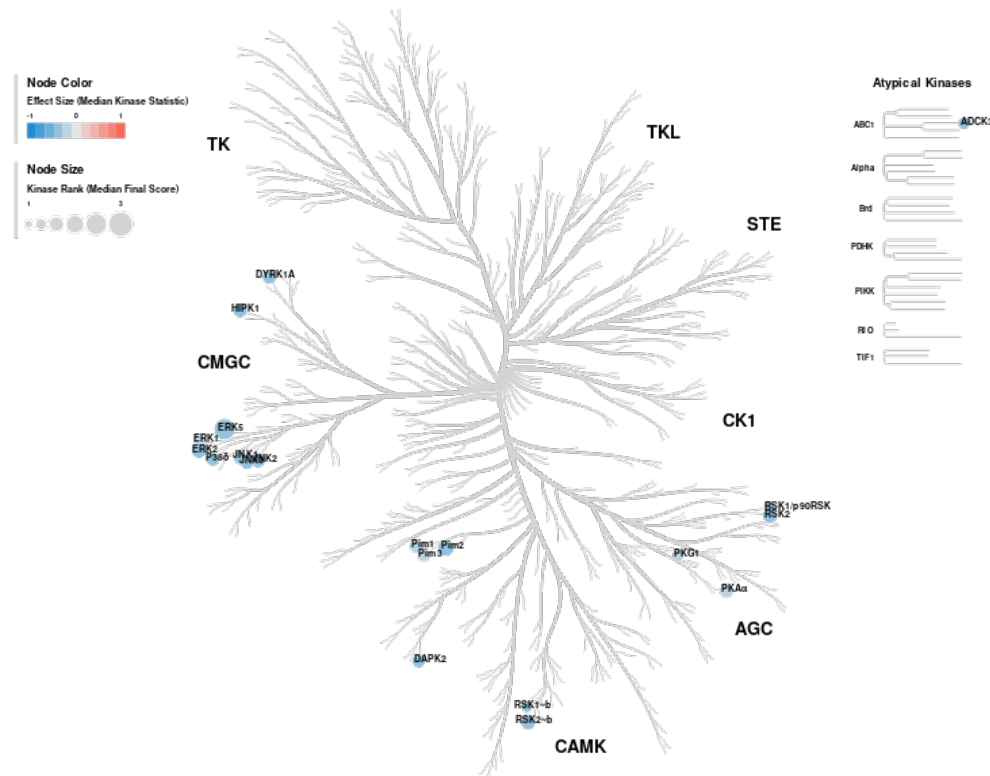


Figure 43 : Profil d'activité du kinome chez les souris Tg(*Dyrk1a*) T en comparaison aux souris Tg(*Dyrk1a*) NT.

La coloration indique la taille et la direction de l'effet (bleu : diminution de l'activité de la cinase ; et rouge : augmentation de l'activité de la cinase), et la taille du cercle indique le score de spécificité de la cinase, c'est-à-dire le classement de la cinase dans l'analyse d'activité des cinases les plus modifiées d'un groupe à l'autre. L'activité cinase de DYRK1A est plus faible chez le souris Tg(*Dyrk1a*) T en comparaison aux souris Tg(*Dyrk1a*) NT. Le traitement de 19 jours avec l'EMD10 inhibe bien l'activité de DYRK1A chez ce modèle.

Afin de mieux visualiser le nombre de cinases dérégulées qui sont communes entre les différentes comparaisons de groupes, des diagrammes de Venn ont été réalisés (Figure 44). Un premier diagramme de Venn a été réalisé en comparant la totalité des cinases (régulées à la

hausse et à la baisse) dérégulées entre les 4 comparaisons : wt T vs wt NT, Tg(*Dyrk1a*) NT vs wt NT, Tg(*Dyrk1a*) T vs wt NT et Tg(*Dyrk1a*) T vs Tg(*Dyrk1a*) NT (**Figure 44A**). Le diagramme révèle un unique élément modifié entre les comparaisons Tg(*Dyrk1a*) NT vs wt NT et Tg(*Dyrk1a*) T vs Tg(*Dyrk1a*) NT. Par ailleurs, une analyse du nombre de kinase régulée à la hausse (« *up regulated* ») et à la baisse (« *down regulated* ») entre les comparaisons Tg(*Dyrk1a*) NT vs wt NT et Tg(*Dyrk1a*) NT vs wt NT a été effectuée (**Figure 44B**). Les comparaisons révèlent un élément qui est régulé à la hausse chez les souris Tg(*Dyrk1a*) NT et Tg(*Dyrk1a*) T, la kinase TBK1. Ainsi, l'activité de cette kinase n'est pas normalisée ou diminuée par l'EMD10 chez les souris Tg(*Dyrk1a*). De plus, 13 et 9 kinases qui présentent respectivement une diminution et une augmentation d'activité chez les souris Tg(*Dyrk1a*) NT sont normalisées suite au traitement à l'EMD10. Enfin, un dernier diagramme de Venn a été réalisé dans le but d'identifier le nombre de kinases dérégulées (à la hausse et à la baisse) entre les comparaisons : Tg(*Dyrk1a*) T vs wt NT et wt T vs wt NT (**Figure 44C**). Quatre kinases dont l'activité est augmentée chez les souris wt T sont régulées à la baisse suite au traitement à l'EMD10 chez les souris Tg(*Dyrk1a*), reflétant un effet du traitement non-dépendant du génotype sur ces 4 kinases : ERK1, P38 δ , JNK1 ainsi que JNK3. Ces résultats doivent être validés par d'autres techniques pour confirmer l'impact du traitement sur les 4 kinases citées précédemment.

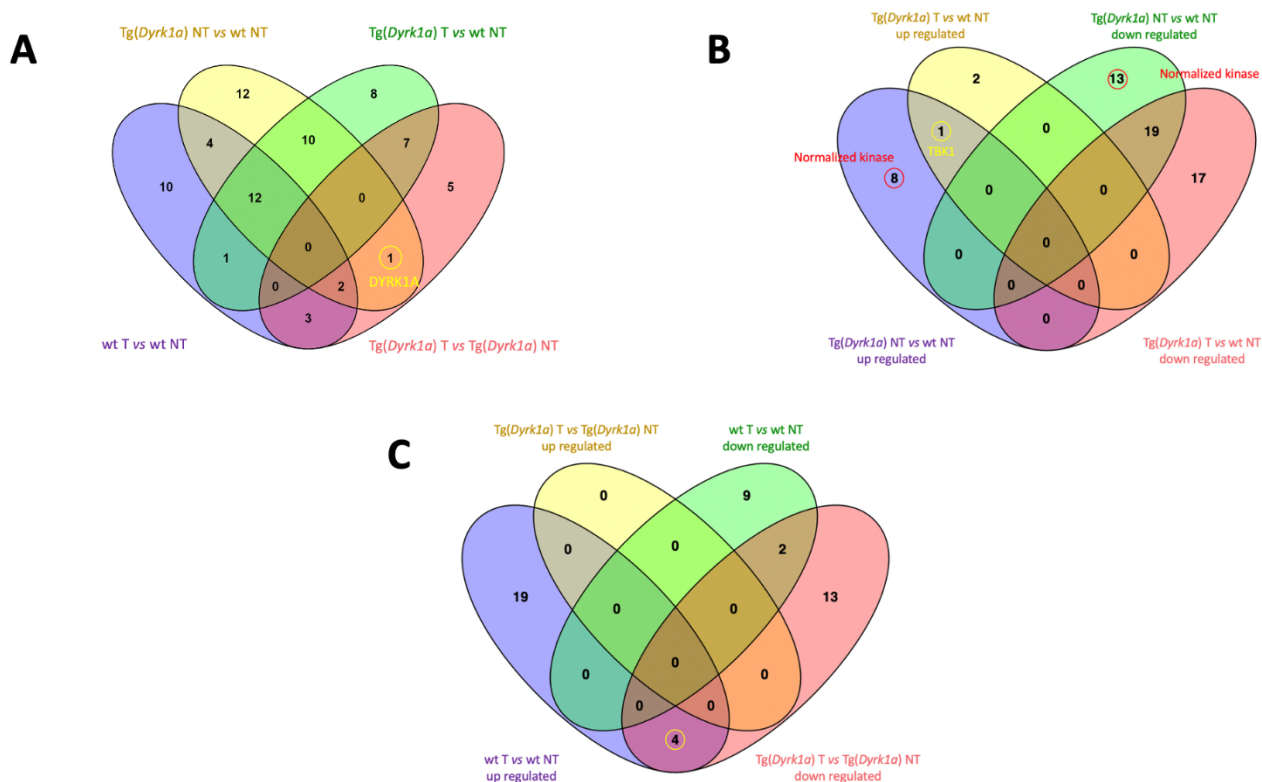


Figure 44 : Représentation du nombre de kinases dérégulées au sein des différentes comparaisons.

(A) Analyse du nombre de kinases dérégulées dans chaque comparaison : wt T vs wt NT, Tg(*Dyrk1a*) NT vs wt NT, Tg(*Dyrk1a*) T vs wt T et Tg(*Dyrk1a*) T vs Tg(*Dyrk1a*) NT. **(B)** Identification du nombre de kinases régulées à la hausse et à la baisse dans les comparaisons : Tg(*Dyrk1a*) NT vs wt NT et Tg(*Dyrk1a*) T vs wt NT. **(C)** Analyse du nombre de kinases dérégulées à la hausse et à la baisse dans les comparaisons : wt T vs wt NT et Tg(*Dyrk1a*) T vs Tg(*Dyrk1a*) NT.

Les phosphosites sur les puces STK de PamChip sont dérivées de substrats de kinase qui font partie de plusieurs voies canoniques. Les numéros d'accès de la base de données de séquences peptidiques UniPROT des substrats différentiels (dont le niveau de phosphorylation est modifié d'un groupe à l'autre) dans les comparaisons Tg(*Dyrk1a*) NT vs wt NT et Tg(*Dyrk1a*) T vs Tg(*Dyrk1a*) NT, ont été importés dans l'outil d'analyse de voie de signalisation Metacore (GeneGO, Thomson Reuters). Cette analyse permet d'identifier un réseau d'interaction entre les données UKA de PamChip et la base de données Metacore. L'analyse révèle que la kinase DYRK1A est liée aux données de PamChip principalement via ASK1 (aussi dit MAP3K5), B-Raf ainsi que ROCK (**Figure 45**). Ces résultats sont uniquement des hypothèses nécessitant des analyses supplémentaires afin de valider ces interactions.

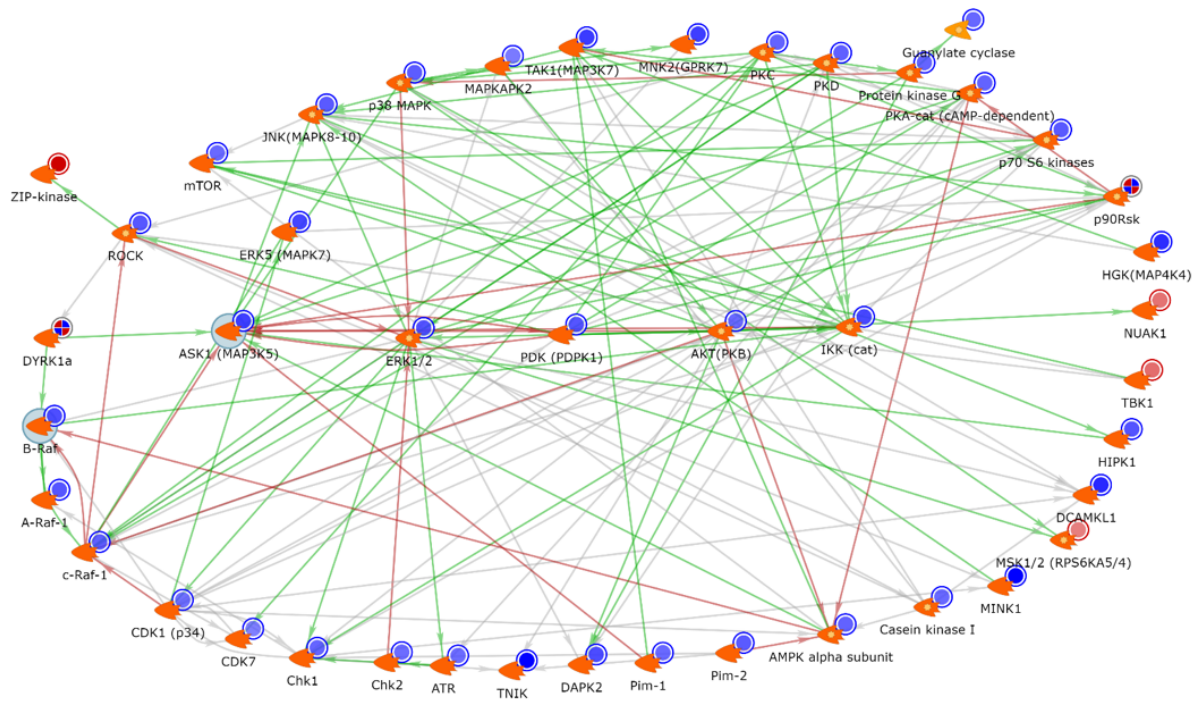


Figure 45 : Analyse des données d'UKA avec le logiciel MetaCore.

Les flèches reliant les kinases représentent les interactions, en rouge une inhibition, en vert une activation, en gris une interaction non spécifiée. Les cercles représentent l'activité des kinases, en bleu une kinase régulée à la baisse et en rouge une kinase régulée à la hausse. Les flèches situées au niveau d'une kinase indiquent le type de kinase, en orange les protéines-kinases et en jaune les lipides-kinases.

Pour conclure sur cette étude réalisée avec la technologie micropuce peptidique PamChip, une augmentation de l'activité de DYRK1A a été observée dans les extraits des souris *Tg(Dyrk1a)* NT par rapport aux souris wt NT. De plus, une inhibition de l'activité de DYRK1A est observée chez les souris *Tg(Dyrk1a)* traitées pendant 19 jours avec l'EMD10 en comparaison aux souris *Tg(Dyrk1a)* NT. Ces résultats confirment les dosages d'activité kinase de DYRK1A présentés précédemment. Les arbres phylogénétiques ont fourni une vue d'ensemble de l'activité des autres kinases dans les comparaisons des différents extraits protéiques. L'analyse des voies de signalisation effectuée sur les données d'UKA pour les comparaisons *Tg(Dyrk1a)* NT vs wt NT et *Tg(Dyrk1a)* T vs *Tg(Dyrk1a)* NT a révélé un lien entre ASK1, B-Raf ainsi que ROCK avec les données obtenues.

II. Étude de l'EMD10 sur le modèle Tg(*Dyrk1a*) pendant 10 jours de traitements

Ayant confirmé l'efficacité de l'EMD10 sur les capacités de mémoires des animaux Tg(*Dyrk1a*) après 19 jours de traitement, l'objectif de cette seconde étude a été de diminuer la durée du traitement et de vérifier si un rétablissement des fonctions mnésiques était toujours observé. Ainsi, pour cette seconde étude, les souris Tg(*Dyrk1a*) ont été traitées avec l'EMD10 toujours à une dose de 3 mg/kg/jour, mais en réduisant la durée du traitement à 10 jours. Encore une fois, les tests du champ ouvert, de l'OPP et du NOP ont été effectués pour évaluer l'effet du traitement. La chronologie de l'étude est détaillée dans la **Figure 46**, ci-dessous.

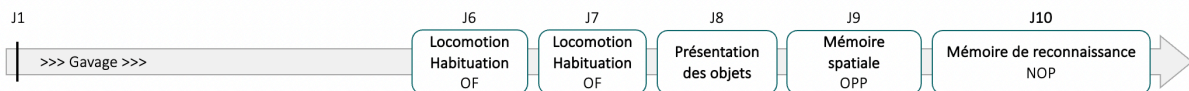


Figure 46 : Chronologie de l'étude de l'EMD10 sur le modèle Tg(*Dyrk1a*) pendant 10 jours de traitement.

Les souris ont été quotidiennement traitées avec l'EMD10 pendant 10 jours (noté J sur la frise chronologique). À partir du 6^{ème} jour de traitement, les tests comportementaux débutent en parallèle du traitement avec deux jours consécutifs d'OF. Le 8^{ème} jour correspond à la phase de présentation des objets. Les tests d'OPP et de NOP sont réalisés respectivement au 9^{ème} et 10^{ème} jour.

1. Effet de l'EMD10 sur les capacités mnésiques des souris Tg(*Dyrk1a*) pendant 10 jours de traitements

Le premier test de comportement débute au 6^{ème} jour de traitement. Deux cohortes d'animaux ont été générées et chaque cohorte est constituée de quatre groupes qui se différencient par leur génotype – souris wt et souris Tg(*Dyrk1a*) – et le traitement, souris T ou NT. Les effectifs par groupe sont les suivants : n = 12 wt NT (dont 6 mâles et 6 femelles), n = 12 wt T (dont 6 mâles et 6 femelles), n = 12 Tg(*Dyrk1a*) NT (dont 6 mâles et 6 femelles) et n = 10 Tg(*Dyrk1a*) T (dont 6 mâles et 4 femelles). Les résultats des tests comportementaux sont présentés dans l'ordre dans lequel ils ont été effectués.

1.1 Activité locomotrice et habitude à l'arène des souris

L'ANOVA à trois facteurs (Génotype x Traitement x Sexe) ne montre pas d'effet significatif du sexe sur la distance parcourue au jour 1 et au jour 2 du test (respectivement $F_{1,38}=0.3993$ et $F_{1,38}=1.111$). Les résultats des souris mâles et femelles ont donc été regroupés. L'ANOVA à deux facteurs (Génotype x Traitement) montre une différence significative de la distance parcourue entre les groupes au premier jour du test du champ ouvert (**Figure 47A**). Au premier jour, les animaux wt NT et T parcourent moins de distance que les souris Tg(*Dyrk1a*) NT, ces derniers sont par conséquent plus actifs ($p<0.01$ wt NT vs Tg(*Dyrk1a*) NT ; $p<0.001$ wt T vs Tg(*Dyrk1a*) NT). Cette hyperactivité disparaît suite au traitement des souris Tg(*Dyrk1a*) avec l'EDM10. En effet, ce groupe ne présente pas de différence significative avec les groupes wt (NT et T). Au deuxième jour, l'ANOVA à deux facteurs (Génotype x Traitement) ne montre aucun effet significatif du génotype sur la distance parcourue ($F_{1,42}=1.340$), mais un effet du traitement est observé (et $F_{1,42}=6.948 - p<0.05$). Le test post-hoc révèle que les souris wt NT parcourent significativement moins de distance que les souris wt T ($p<0.05$). Enfin, pour évaluer l'habitude au nouvel environnement, la distance parcourue pour chacun des groupes au premier jour du test a été comparée à celle du deuxième jour (**Figure 47B**). L'ANOVA à trois facteurs (Génotype x Traitement x Jour) met en évidence un effet du jour pour les souris Tg(*Dyrk1a*) NT et T et non pour les souris contrôles ($F_{1,84}=46.14 - p<0.0001$). En effet, le test post-hoc montre une diminution de la distance parcourue entre le jour 1 et le jour 2 pour les groupes Tg(*Dyrk1a*) NT ($p<0.0001$) et T ($p<0.001$), reflétant une habitude de ces animaux à l'arène. Les souris wt T présentent une diminution de la distance parcourue au jour 2 par rapport au jour 1, mais cette réduction n'est pas statistiquement pas significative ($p=0.116$).

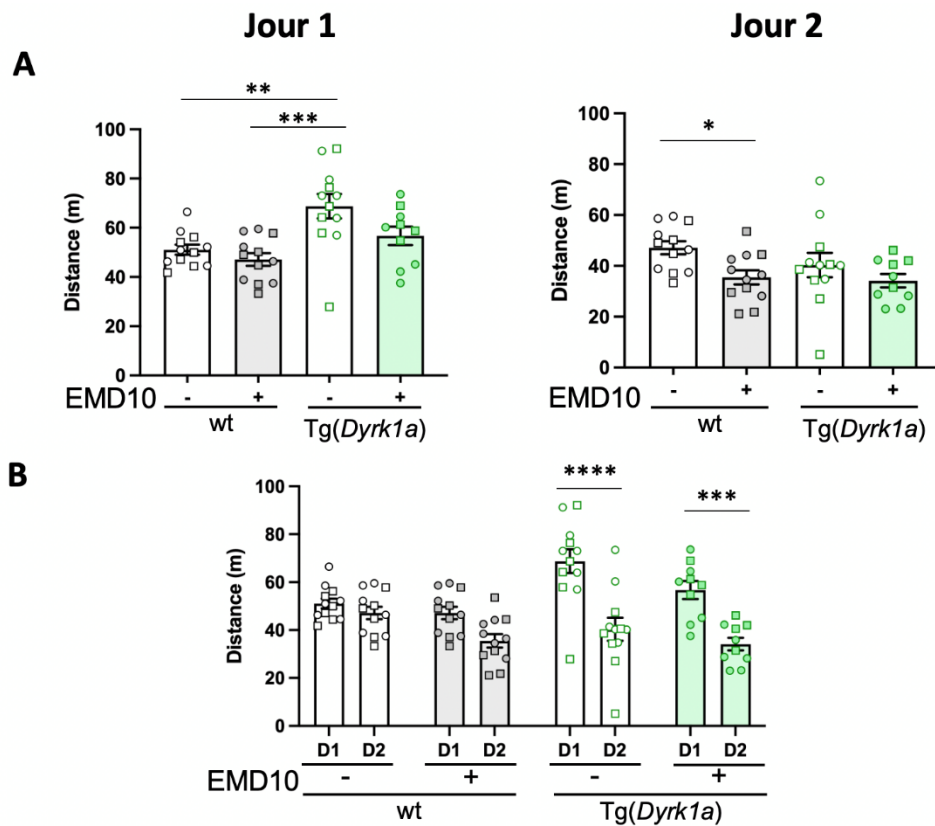


Figure 47 : Distance parcourue dans le test du champ ouvert chez les souris *Tg(Dyrk1a)* traitées avec l'EMD10.

Les souris mâles et femelles sont respectivement représentées par des cercles et des carrés. **(A)** Distance parcourue pendant les deux jours d'habituation. Au jour 1 du test, les groupes wt (NT et T) parcourent significativement moins de distance que le groupe *Tg(Dyrk1a)* NT, reflétant une hyperactivité de ses derniers. Au jour 2, aucune différence de la distance parcourue n'est observée entre les groupes. **(B)** Comparaison des distances parcourues entre le jour 1 et le jour 2. À l'exception du groupe wt T, les autres groupes parcourent significativement moins de distance le deuxième jour du test par rapport au premier. Les valeurs représentent des moyennes \pm erreur-type. Statistiques : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

1.2 Mémoire de reconnaissance de position

Comme dans l'étude précédente, le test de l'OPP a été utilisé pour mesurer l'effet de l'EMD10 sur la mémoire spatiale des souris *Tg(Dyrk1a)* et l'analyse a été réalisée après 10 et 14 min de test. Un ANOVA à trois facteurs (Génotype X Traitement X Sexe) a été réalisé pour analyser l'effet du sexe sur le pourcentage d'exploration de l'objet déplacé. Aucun effet du sexe

n'ayant été observé ($F_{1,38}=0.03962$), les résultats des mâles et des femelles ont donc été regroupés (**Figure 48**). L'ANOVA à deux facteurs (Génotype x Traitement) souligne un effet du génotype à 10 min ($F_{1,42}=14.18$, $p<0.001$) et 14 min ($F_{1,42}=6.5$, $p<0.05$). Le test post-hoc révèle que les souris Tg(*Dyrk1a*) NT passent significativement moins de temps à explorer l'objet déplacé par rapport aux souris wt NT ($p<0.01$). L'analyse avec l'ANOVA à deux facteurs souligne également un effet du traitement à 14 min ($F_{1,42}=10.13$, $p<0.01$). Le post-hoc permet de mettre en évidence une diminution du temps d'exploration de l'objet déplacé chez les souris Tg(*Dyrk1a*) NT par rapport aux Tg(*Dyrk1a*) NT ($p<0.01$) à 14 min, mais cette différence n'est pas visible à 10 min de test. Les résultats à 10 min et 14 min montrent que les animaux contrôles (wt NT et T) passent significativement plus de 50% de leur temps à explorer l'objet déplacé ($p<0.01$ pour wt NT à 10 et 14 min ; $p<0.0001$ et $p<0.001$ pour wt T à 10 et 14 min). Cela n'est pas le cas du groupe Tg(*Dyrk1a*) NT qui présente un déficit de leur mémoire de reconnaissance de la position de l'objet. Au bout de 10 min de test, les souris Tg(*Dyrk1a*) T ne discriminent pas l'objet déplacé de l'objet familier. Cependant, une tendance à la significativité est visible avec une moyenne de temps passée sur l'objet déplacé de 56,7%. Ce chiffre atteindra la significativité après 14 min de test. En effet, les souris Tg(*Dyrk1a*) T passent significativement plus de 50% du temps sur l'objet déplacé à la fin du test de l'OPP ($p<0.01$ à 14 min). Les différences de résultats à 10 et 14 min pour le groupe des souris Tg(*Dyrk1a*) T peut en partie provenir du plus faible nombre de souris dans ce groupe, $n=10$ par rapport à $n=12$ dans les autres groupes.

Un traitement de 10 jours avec l'EMD10 est également capable de corriger la mémoire spatiale du modèle murin Tg(*Dyrk1a*).

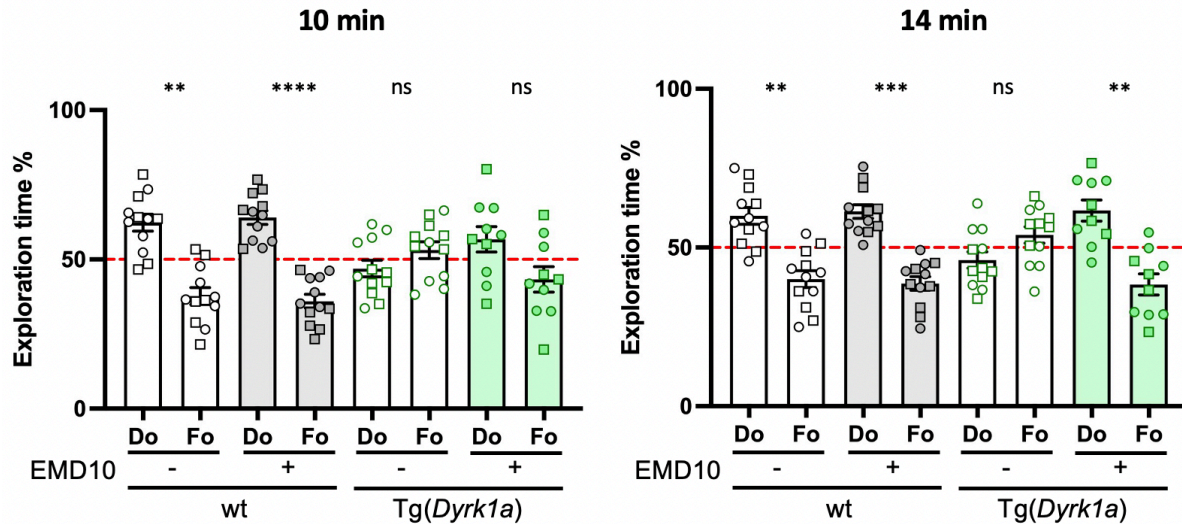


Figure 48 : Effet de l'EMD10 sur la mémoire spatiale des souris *Tg(Dyrk1a)* sur 10 jours de traitement.

L'objet déplacé est noté Do et l'objet familier non déplacé est noté Fo. Dans chaque groupe, les souris mâles sont représentées par des cercles et les femelles par des carrés. Au deux temps (10 et 14 min), un déficit de la mémoire spatiale est relevée chez les souris *Tg(Dyrk1a)* NT alors que le groupe *Tg(Dyrk1a)* T, comme les groupes wt, explorent plus de 50% du temps le Do que le Fo. Les valeurs représentent des moyennes \pm erreur-type. Statistiques : ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs hasard (50%) ; ns pour non significatif.

1.3 Mémoire de reconnaissance d'objet

L'effet de l'EMD10 sur la mémoire de reconnaissance chez les souris *Tg(Dyrk1a)* traitées pendant 10 jours a été évalué avec le test du NOP. Un ANOVA à trois facteurs (Génotype x Traitement x Sexe) a été réalisé pour analyser l'effet du sexe sur le pourcentage d'exploration des objets. Aucun effet du sexe n'a été observé ($F_{1,38}=1.907$). Les résultats des mâles et des femelles ont donc été réunis (Figure 49). L'ANOVA à deux facteurs (Génotype x Traitement) met en évidence uniquement un effet significatif du traitement à 14 min ($F_{1,42}=7.928$, $p < 0.01$). En effet, les souris *Tg(Dyrk1a)* NT explorent significativement moins l'objet nouveau que les souris *Tg(Dyrk1a)* T ($p < 0.05$). Comme indiqué sur la Figure 49, les souris contrôles NT et T montrent une préférence pour l'objet nouveau par rapport au hasard, 50% ($p < 0.05$ pour wt NT à 10 et 14 min ; $p < 0.001$ pour wt T à 10 et 14 min). Les souris *Tg(Dyrk1a)* NT sont bien

déficitaires dans le test du NOP car elles ne discriminent pas l'objet nouveau de l'objet familier. En revanche, les souris Tg(*Dyrk1a*) T passent significativement plus de 50% du temps sur l'objet nouveau reflétant une préservation du souvenir de l'objet familier ($p < 0.05$ à 10 min ; $p < 0.01$ à 14 min).

Ces résultats indiquent que le traitement à l'EMD10 pendant 10 jours permet également le rétablissement de la mémoire de reconnaissance des souris transgéniques pour le gène *Dyrk1a*.

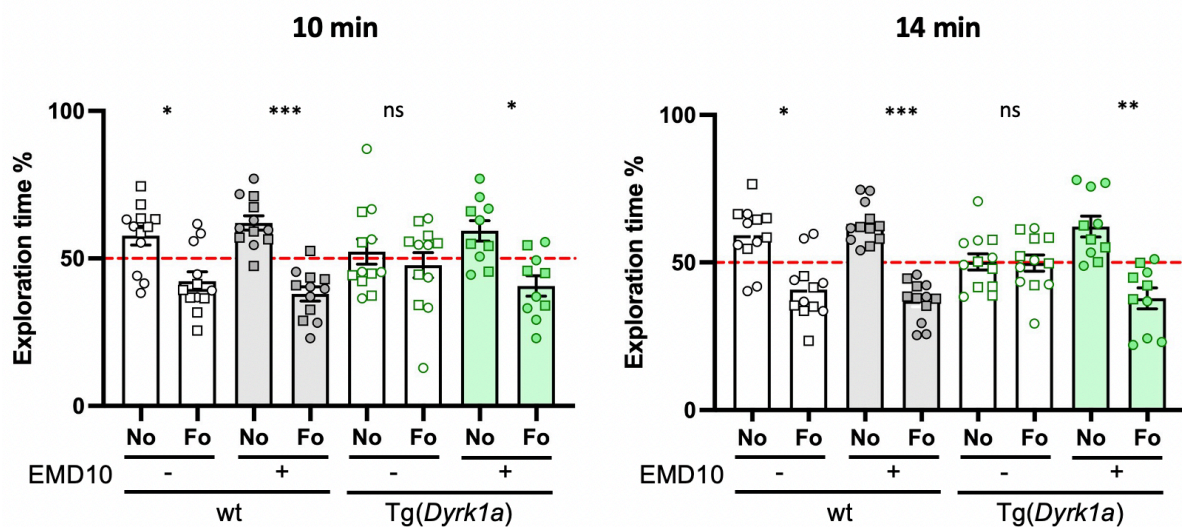


Figure 49 : Effet de l'EMD10 sur la mémoire de reconnaissance des souris Tg(*Dyrk1a*) mesurée dans le test du NOP.

L'objet nouveau est noté No et l'objet familier est noté Fo. Dans chaque groupe, les souris mâles sont représentées par des cercles et les femelles par des carrés. Pour l'analyse aux deux temps (10 et 14 min) un déficit de la mémoire de reconnaissance d'objet est observé chez les souris Tg(*Dyrk1a*) NT alors que le groupe Tg(*Dyrk1a*) T, comme les groupes wt, explorent plus de 50% du temps le No que le Fo. Les valeurs représentent des moyennes \pm erreur-type. Statistiques : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, vs hasard (50%) ; ns pour non significatif.

III. Étude de l'EMD92 sur le modèle Tg(*Dyrk1a*) pendant 10 jours de traitements

Pour cette troisième étude d'inhibiteur de DYRK1A, la Leucettinib testée est l'EMD92. Elle est caractérisée par une meilleure capacité d'inhibition de la kinase DYRK1A (IC50 = 1.2 nM). De ce fait cette seconde molécule a été testée chez le modèle Tg(*Dyrk1a*) pendant 10 jours à une dose dix fois plus faible que l'EMD10 : 0.3 mg/kg/jour. Comme pour les études précédentes, une batterie de tests comportementaux a été réalisée : le test de l'OF, l'OPP et le NOP. Sachant que les souris Tg(*Dyrk1a*) présentent aussi un déficit de la mémoire de travail mesurée dans le test du labyrinthe en Y, ce test a donc aussi été réalisé au 5^{ème} jour de l'étude (Duchon et al. 2021). La chronologie de l'étude est détaillée dans le **Figure 50**.

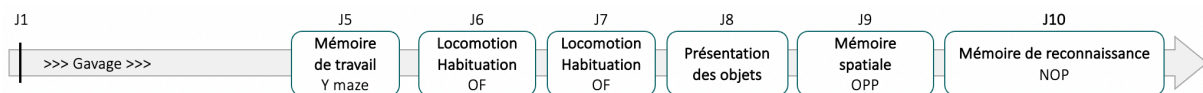


Figure 50 : Chronologie de l'étude de l'EMD92 sur le modèle Tg(*Dyrk1a*).

Les souris ont été quotidiennement traitées avec le second inhibiteur de DYRK1A, l'EMD92 pendant 10 jours (noté J sur la frise chronologique). Les tests comportementaux débutent au 5^{ème} jour de traitement avec le test du labyrinthe en Y, en anglais « *Y maze* ». Les 6^{ème} et 7^{ème} jours de traitement correspondent au test d'OF. Le 8^{ème} jour correspond à la phase de présentation des objets. Les tests d'OPP et du NOP sont réalisés respectivement au 9^{ème} et 10^{ème} jour.

1. Effet de l'EMD92 sur les fonctions mnésiques des souris Tg(*Dyrk1a*) pendant 10 jours de traitement

L'analyse comportementale débute au 5^{ème} jour de traitement avec le test du labyrinthe en Y. Les animaux ont été répartis en quatre cohortes, chacune composée de quatre groupes : le groupe wt NT (n = 24 dont 12 mâles et 12 femelles), le groupe wt T (n = 24 dont 12 mâles et 12 femelles) ainsi que les groupes Tg(*Dyrk1a*) NT (n = 24 dont 12 mâles et 12 femelles) et T (n = 24 dont 12 mâles et 12 femelles). Les résultats des tests comportementaux sont présentés dans l'ordre dans lequel ils ont été effectués.

1.1 Labyrinthe en Y

Le test du labyrinthe en Y permet d'évaluer la mémoire de travail se basant sur la tendance spontanée des souris à explorer un environnement nouveau. Le taux d'alternance spontanée est quantifié et analysé. En raison d'un problème technique au cours du test, les résultats de la cohorte 1 sont inexploitable. L'analyse a donc été réalisée avec les cohortes 2, 3 ainsi que 4 et les effectifs sont les suivants : $n = 18$ wt NT, $n = 18$ wt T, $n = 18$ Tg(*Dyrk1a*) NT et $n = 18$ Tg(*Dyrk1a*) T.

L'absence d'effet du sexe sur le pourcentage d'alternance spontanée a été vérifiée avec un ANOVA à trois facteurs (Génotype x Traitement x Sexe) ($F_{1,64}=0.03051$). Les résultats des souris mâles et femelles ont été regroupés. Aucune différence de la latence de sortie de bras n'est observée entre les quatre groupes (test de Kruskal-Wallis) (**Figure 51A**). Un ANOVA à deux facteurs (Génotype x Traitement) révèle un effet du traitement ($F_{1,68}=6.915 - p<0.05$) et du génotype ($F_{1,68}=22.81 - p<0.0001$) sur le nombre total de bras visités au cours du test (**Figure 51B**). En effet, une augmentation du nombre total de bras visités est observée chez les souris Tg(*Dyrk1a*) NT par rapport aux trois autres groupes, reflétant une hyperactivité des souris Tg(*Dyrk1a*) corrigée avec l'EMD92 ($p<0.0001$ wt NT et T vs Tg(*Dyrk1a*) NT ; $p<0.05$ Tg(*Dyrk1a*) T vs Tg(*Dyrk1a*) NT). Pour l'analyse du pourcentage d'alternance réalisée par les différents groupes, l'ANOVA à deux facteurs (Génotype x Traitement) ne montre pas d'effet significatif du génotype ($F_{1,68}=1.324$) ou du traitement ($F_{1,68}=0.7917$). En revanche, la comparaison du pourcentage d'alternance spontanée au hasard, 50% (One sample *t*-Test) montre que les groupes wt NT et T réalisent plus de 50% d'alternances spontanées ($p<0.001$) (**Figure 51C**). Ce qui n'est pas le cas du groupe Tg(*Dyrk1a*) NT, reflétant une altération de la mémoire de travail qui est corrigée chez les Tg(*Dyrk1a*) T. En effet, ce dernier groupe réalise comme les groupes contrôles plus de 50% d'alternances spontanées ($p<0.01$).

Ces résultats mettent en lumière un rétablissement de la mémoire de travail des souris Tg(*Dyrk1a*) traitées avec l'EMD92, et cela, dès 5 jours de traitement.

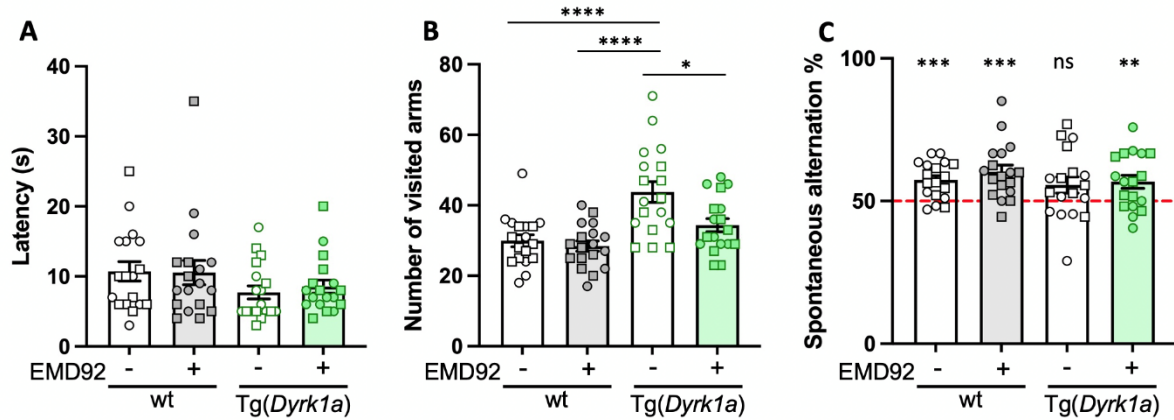


Figure 51 : Effet de l'EMD92 sur l'activité locomotrice et la mémoire de travail des souris Tg(Dyrk1a).

Les cercles et les carrés représentent respectivement les souris mâles et les femelles. **(A)** Latence de sortie du premier bras. Aucune différence n'est observée entre les différents groupes. **(B)** Nombre total de bras visité. Les souris wt NT et T ainsi que Tg(Dyrk1a) T visitent significativement moins de bras que les souris Tg(Dyrk1a) NT. **(C)** Pourcentage d'alternance spontanée réalisée. Les souris wt NT et T ainsi que les souris Tg(Dyrk1a) T réalisent plus de 50% d'alternance spontanée, ce qui n'est pas le cas des souris Tg(Dyrk1a) NT. Les valeurs représentent des moyennes \pm erreur-type. Statistiques : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. hasard (50%) ; ns pour non significatif.

1.2 Activité locomotrice et habitude à l'arène des souris

L'ANOVA à trois facteurs (Génotype x Traitement x Sexe) ne montre pas d'effet significatif du sexe sur la distance parcourue au jour 1 et au jour 2 du test (respectivement $F_{1,88}=0.006$ et $F_{1,88}=0.465$). Les résultats des souris mâles et femelles ont donc été regroupés. L'ANOVA à deux facteurs (Génotype x Traitement) ne montre aucun effet significatif du génotype ou du traitement sur la distance parcourue au jour 1 et au jour 2 du test ($F_{1,92}=2.367$ et $F_{1,92}=1.173$ pour le génotype respectivement au jour 1 et 2 ; $F_{1,92}=0.2532$ et $F_{1,92}=3.283$ pour le traitement respectivement au jour 1 et 2) (**Figure 52A**). L'habitude des animaux à l'arène a été vérifiée en comparant la distance parcourue pour chacun des groupes entre les jours 1 et 2 du test (**Figure 52B**). L'ANOVA à trois facteurs (Génotype x Traitement x Jour) montre un effet du jour pour chacun des groupes ($F_{1,184}=246.7 - p < 0.0001$). En effet, le test post-hoc met en évidence une réduction de la distance parcourue entre le jour 1 et le jour 2 pour chacun des groupes, reflétant une habitude des animaux au nouvel environnement ($p < 0.0001$).

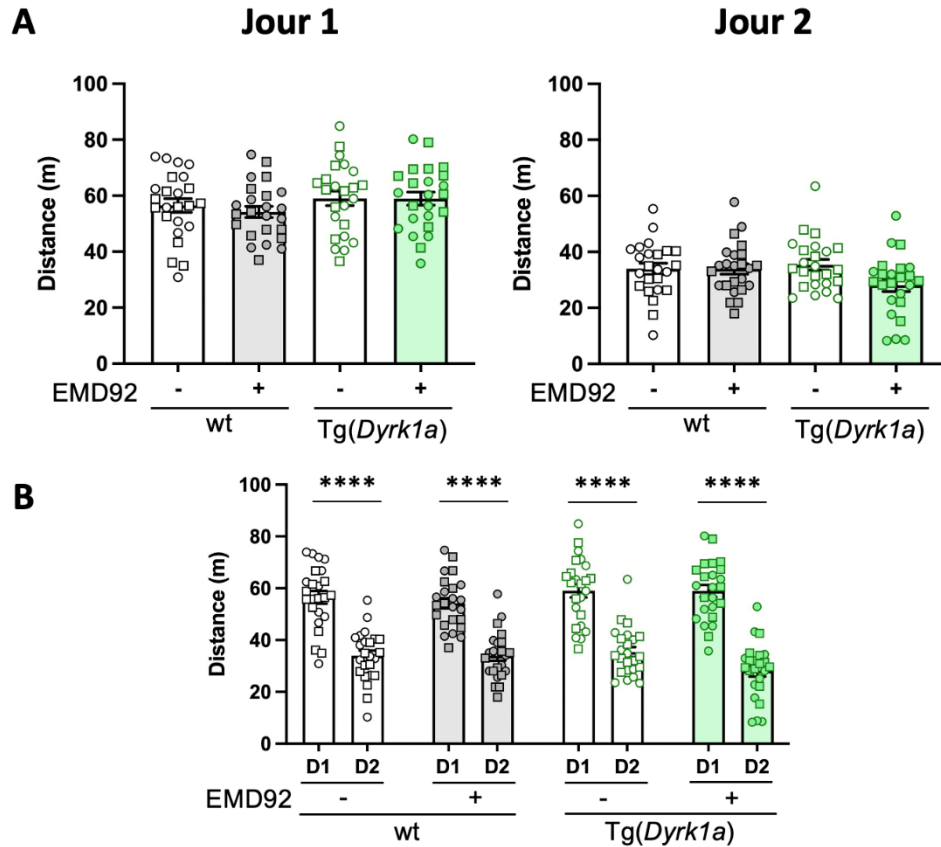


Figure 52 : Distance parcourue dans le test du champ ouvert chez les souris *Tg(Dyrk1a)* traitées avec l'EMD92.

Les cercles et les carrés représentent respectivement les souris mâles et les femelles. **(A)** Distance parcourue pendant les deux jours d'habituation. Aux jours 1 et 2, aucune différence significative de la distance parcourue n'est observée entre les groupes. **(B)** Comparaison des distances parcourues entre le jour 1 et le jour 2. Tous les groupes étudiés parcourent moins de distance le deuxième jour du test que le premier. Les valeurs représentent des moyennes \pm erreur-type. Statistiques : **** $p < 0.0001$.

1.3 Mémoire de reconnaissance de position

Le test de l'OPP a été utilisé pour mesurer l'effet de l'EMD92 sur la mémoire spatiale des souris *Tg(Dyrk1a)*. Un ANOVA à trois facteurs (Génotype X Traitement X Sexe) a été réalisé pour analyser l'effet du sexe sur le pourcentage d'exploration des objets. Aucun effet du sexe n'ayant été observé ($F_{1,88}=0.03196$ à 10 min et $F_{1,88}=0.2397$ à 14 min), les résultats des mâles et des femelles ont été regroupés. Les résultats du test de l'OPP ont été analysés après 10 min et 14 min de test (**Figure 53**). L'ANOVA à deux facteurs (Génotype x Traitement) ne révèle aucun

effet ni du génotype ($F_{1,92}=1.860$ à 10 min ; $F_{1,92}=1.350$ à 14 min), ni du traitement ($F_{1,92}=0.8410$ à 10 min ; $F_{1,92}=3.105$ à 14 min). L'analyse du pourcentage d'exploration des objets par rapport à la valeur du hasard (50%) montre que les souris contrôles (wt NT et T) explorent plus de 50% du temps l'objet déplacé ($p<0.05$ wt NT à 10 min et $p<0.01$ à 14 min ; $p<0.05$ wt T à 10 min et $p<0.01$ à 14 min, One sample *t*-test). Comme attendu, les souris Tg(*Dyrk1a*) NT ont un déficit de la mémoire de reconnaissance de la position de l'objet alors que les souris Tg(*Dyrk1a*) T passent significativement plus de 50% du temps sur l'objet déplacé ($p<0.001$ à 10 et 14 min).

Ces résultats montrent la correction de la mémoire spatiale du modèle murin Tg(*Dyrk1a*) suite au traitement avec l'EMD92.

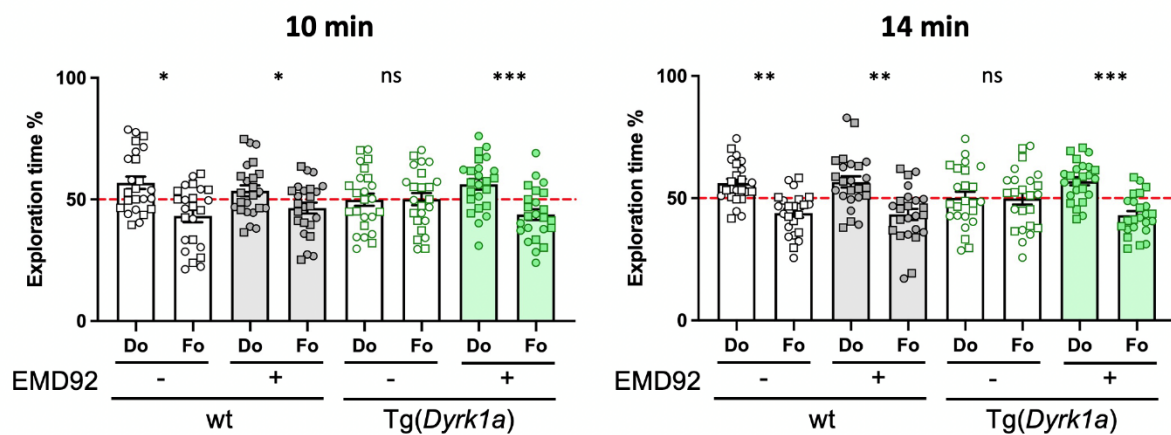


Figure 53 : Effet de l'EMD92 sur la mémoire spatiale des souris Tg(*Dyrk1a*) sur 10 jours de traitement.

L'objet déplacé est noté Do et l'objet familier non déplacé est noté Fo. Dans chaque groupe, les souris mâles sont représentées par des cercles et les femelles par des carrés. Après 10 et 14 min de test, le groupe Tg(*Dyrk1a*) T, comme les groupes wt, passent plus de 50% du temps à explorer le Do que le Fo. Ce qui n'est pas le cas des souris Tg(*Dyrk1a*) NT qui présentent un déficit de leur mémoire spatiale. Les valeurs représentent des moyennes \pm erreur-type. Statistiques : * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs hasard (50%) ; ns pour non significatif.

1.4 Mémoire de reconnaissance d'objet

L'effet de l'EMD92 sur la mémoire de reconnaissance chez les souris Tg(*Dyrk1a*) traitées pendant 10 jours a été évalué avec le test du NOP. En raison de problème technique au cours

de l'expérience, les résultats de deux souris mâles du groupe Tg(*Dyrk1a*) NT manquent à l'étude. Les effectifs sont donc les suivants : n = 24 wt NT, n = 24 wt T, n = 22 Tg(*Dyrk1a*) NT et n = 24 Tg(*Dyrk1a*) T. Un ANOVA à trois facteurs (Génotype x Traitement x Sexe) a été réalisé pour analyser l'effet du sexe sur le pourcentage d'exploration des objets. Aucun effet du sexe n'a été observé ($F_{1,86}=0.04426$ à 10 min et $F_{1,86}=0.02708$ à 14 min). Les résultats des mâles et des femelles ont donc été réunis. L'ANOVA à deux facteurs (Génotype x Traitement) ne révèle aucun effet ni du génotype ($F_{1,90}=1.176$ à 10 min ; $F_{1,90}=2.148$ à 14 min), ni du traitement ($F_{1,90}=0.62$ à 10 min ; $F_{1,90}=1.532$ à 14 min).

Ensuite, le pourcentage de temps d'exploration des objets a été mesuré comparé à 50% (hasard) après 10 min et 14 min de test (One sample *t*-test). Comme indiqué sur la Figure 54, les souris contrôles NT et T montrent une préférence pour l'objet nouveau par rapport au hasard, 50% ($p<0.01$ et $p<0.001$ pour wt NT respectivement à 10 et 14 min ; $p<0.05$ pour wt T à 10 et 14 min). Les souris Tg(*Dyrk1a*) NT ne discriminant pas l'objet nouveau de l'objet familier, elles sont donc déficitaires dans le test du NOP. En revanche, les souris Tg(*Dyrk1a*) T passent significativement plus de 50% du temps sur l'objet nouveau reflétant une préservation du souvenir de l'objet familier ($p<0.05$ à 10 et 14 min).

Ces résultats indiquent que le traitement à l'EMD92 pendant 10 jours permet également de rétablir la mémoire de reconnaissance qui est altérée chez les souris transgéniques pour le gène *Dyrk1a*.

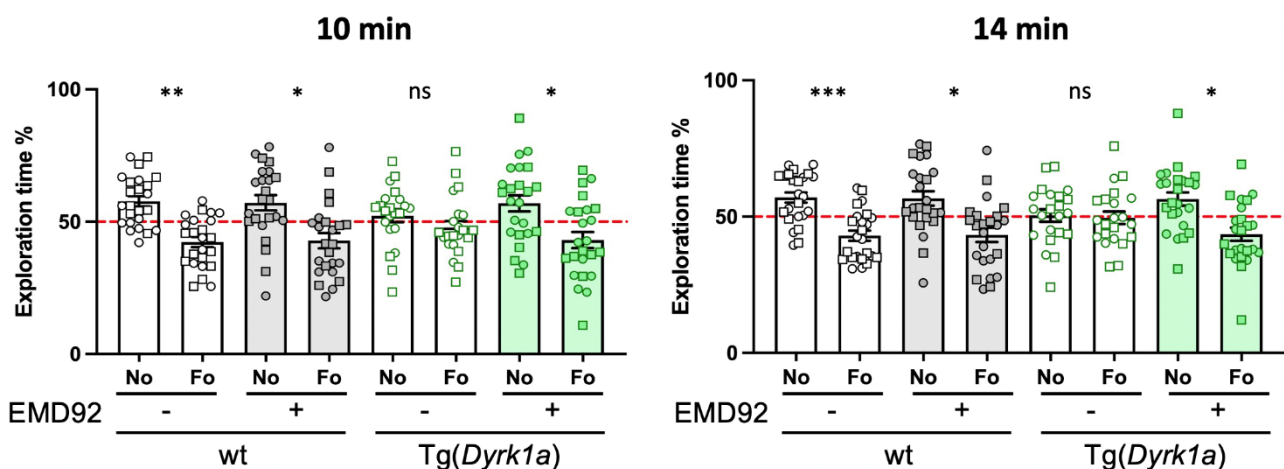


Figure 54 : Effet de l'EMD92 sur la mémoire de reconnaissance des souris Tg(*Dyrk1a*) mesurée dans le test du NOP.

L'objet nouveau est noté No et l'objet familier est noté Fo. Dans chaque groupe, les souris mâles sont représentées par des cercles et les femelles par des carrés. Après 10 et 14 min de test, un déficit de la mémoire de reconnaissance d'objet est observé chez les souris Tg(*Dyrk1a*) NT alors que le groupe Tg(*Dyrk1a*) T, comme les groupes wt, explorent plus de 50% du temps le No que le Fo. Les valeurs représentent des moyennes \pm erreur-type. Statistiques : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, vs hasard (50%) ; ns pour non significatif.

IV. Étude de l'EMD92 sur le modèle Dp1Yey pendant 11 jours de traitements

Une fois avoir validé l'efficacité de l'EMD92 sur le modèle Tg(*Dyrk1a*), cette même molécule a été testée sur un modèle plus complexe du SD, le modèle Dp1Yey. Le traitement a été réalisé à une dose de 0.3 mg/kg – validé sur le modèle Tg(*Dyrk1a*) – pendant 11 jours de traitement. Les mêmes tests comportementaux que l'étude précédente ont été réalisés : le labyrinthe en Y, l'OF, l'OPP et le NOP (**Figure 55**). Au 11^{ème} jour de traitement, une étude d'imagerie cérébrale a été effectuée sur les animaux afin d'évaluer l'impact du traitement sur l'activité cérébrale des souris.

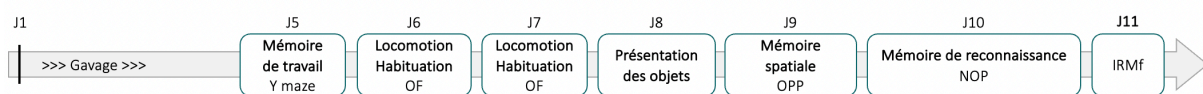


Figure 55 : Chronologie de l'étude de l'EMD92 sur le modèle Dp1Yey.

Pour cette dernière étude, les souris ont été quotidiennement traitées avec l'EMD92 pendant 11 jours (noté J sur la frise chronologique). Les tests comportementaux débutent au 5^{ème} jour de traitement avec le test du labyrinthe en Y. Les 6^{ème} et 7^{ème} jours de traitement correspondent au test de l'OF. Le 8^{ème} jour correspond à la phase de présentation des objets. Les tests de l'OPP et du NOP sont réalisés respectivement au 9^{ème} et 10^{ème} jour. Le 11^{ème} jour correspond à l'IRMf.

1. Effet de l'EMD92 sur les fonctions mnésiques des souris Dp1Yey pendant 11 jours de traitement

Dans cette étude, les tests comportementaux sont réalisés à partir du 5^{ème} jour de traitement. Les animaux ont été répartis en quatre cohortes et chaque cohorte est constituée de quatre groupes qui se différencient par leur génotype – souris wt et souris Dp1Yey – et le traitement, souris T ou NT. Les études d'IRMf mettent en évidence des différences d'activité cérébrale entre les mâles et femelles, par conséquent, seules les souris mâles ont été utilisées au cours de cette étude afin d'éviter l'influence des cycles hormonaux (Hjelmervik et al. 2014). Les effectifs par groupe sont les suivants : n = 14 wt NT, n = 14 wt T, n = 14 Dp1Yey NT et n = 14 Dp1Yey T.

1.1 Labyrinthe en Y

Comme expliqué précédemment, le test du labyrinthe en Y permet d'évaluer la mémoire de travail en se basant sur le taux d'alternance spontanée réalisé par les animaux. Concernant la latence de sortie du premier bras, le test de Kruskal-Wallis ne montre pas d'effet significatif entre les groupes (**Figure 56A**). Une ANOVA à deux facteurs (Génotype x Traitement) révèle un effet du génotype ($F_{1,52}=15.72 - p<0.001$) sur le nombre total de bras visités pendant le test (**Figure 56B**). En effet, le test post-hoc souligne une augmentation du nombre total de bras visités chez les souris Dp1Yey par rapport aux souris contrôles, reflétant une hyperactivité des souris Dp1Yey ($p<0.05$ wt NT et T vs Dp1Yey NT et T). Pour l'analyse du pourcentage d'alternance réalisée par les différents groupes, l'ANOVA à deux facteurs (Génotype x Traitement) ne montre pas d'effet significatif du génotype ($F_{1,52}=2.438$) ou du traitement ($F_{1,52}=0.3416$). De plus, la comparaison du pourcentage d'alternance spontanée au hasard, 50% (One sample *t*-Test) montre que les quatre groupes réalisent plus de 50% d'alternances spontanées ($p<0.0001$ wt NT et T ; $p<0.001$ Dp1Yey NT et T) (**Figure 56C**).

L'absence de déficit de la mémoire de travail des souris Dp1Yey ne permet pas de conclure sur l'efficacité du traitement sur ce type de mémoire.

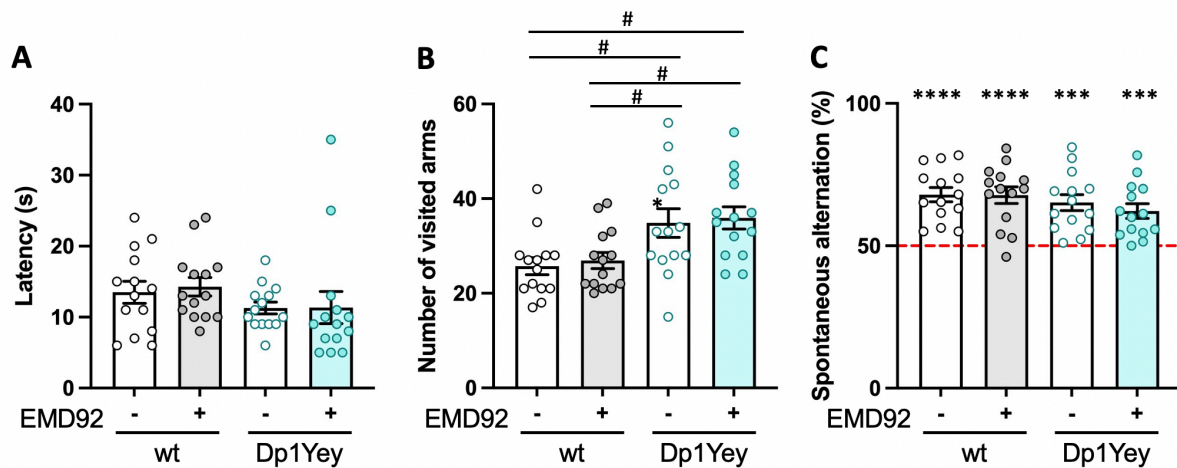


Figure 56 : Effet de l'EMD92 sur l'activité locomotrice et la mémoire de travail des souris Dp1Yey.

(A) Latence de sortie du premier bras. Aucune différence n'est observée entre les groupes. (B) Nombre total de bras visités. Les souris wt NT et T visitent significativement moins de bras que les souris Dp1Yey NT et T. (C) Pourcentage d'alternance spontanée réalisée. Les souris wt NT et T ainsi que les souris Dp1Yey NT et T réalisent plus de 50% d'alternance spontanée. Les valeurs représentent des moyennes \pm erreur-type. Statistiques : # $p < 0.05$ et **** $p < 0.0001$ vs hasard (50%).

1.2 Activité locomotrice et habitude à l'arène des souris

L'ANOVA à deux facteurs (Génotype x Traitement) ne montre pas d'effet significatif du génotype ou du traitement sur la distance parcourue au jour 1 et au jour 2 du test ($F_{1,52}=0.7856$ et $F_{1,52}=2.314$ pour le génotype respectivement au jour 1 et 2 ; $F_{1,52}=0.3499$ et $F_{1,52}=0.01317$ pour le traitement respectivement au jour 1 et 2). Les résultats des souris mâles et femelles pour la distance parcourue ont donc été regroupés (Figure 57A). La distance parcourue pour chacun des groupes a été comparée entre les jours 1 et 2 dans le but de vérifier l'habitude des souris au nouvel environnement (Figure 57B). L'ANOVA à trois facteurs (Génotype x Traitement x Jour) montre un effet du jour pour chacun des groupes ($F_{1,104}=104.8 - p < 0.0001$). Le test post-hoc souligne une diminution de la distance parcourue observée entre le jour 1 et

le jour 2 pour chacun des groupes, reflétant une habitude des animaux à l'arène ($p < 0.001$ jour 1 vs jour 2 pour wt NT ; $p < 0.0001$ jour 1 vs jour 2 pour wt T, Dp1Yey NT et T).

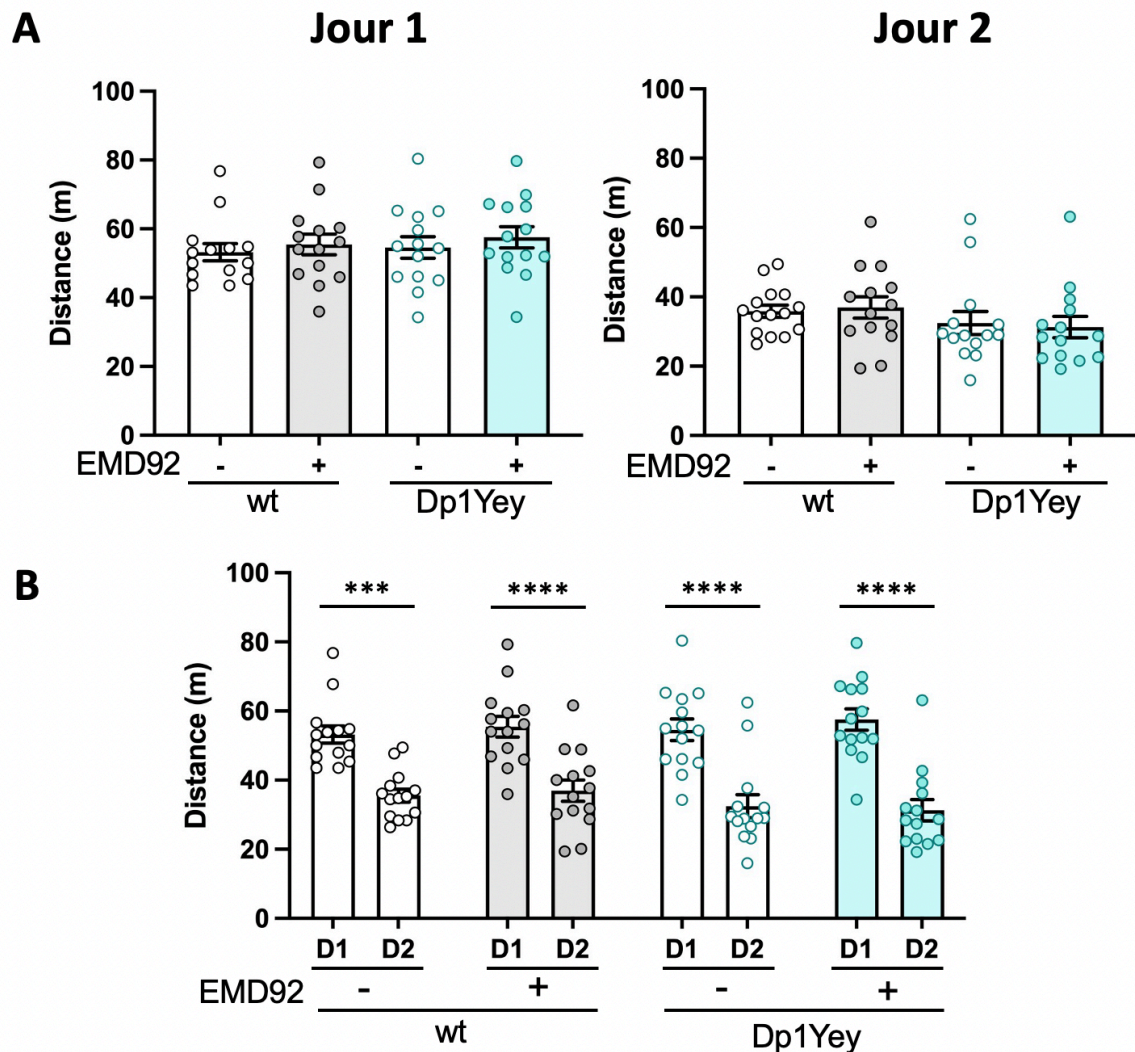


Figure 57 : Distance parcourue dans le test du champ ouvert chez les souris Dp1Yey traitées avec l'EMD92.

(A) Distance parcourue pendant les deux jours d'habituation. Aux deux jours du test, aucune différence significative de la distance parcourue n'est observée entre les groupes. (B) Comparaison des distances parcourues entre le jour 1 et le jour 2. Tous les groupes étudiés parcourent moins de distance le deuxième jour du test que le premier. Les valeurs représentent des moyennes \pm erreur-type. Statistiques : *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

1.3 Mémoire de reconnaissance de position

Comme pour les précédentes études, le test de l'OPP a été utilisé afin d'évaluer l'impact du traitement des souris Dp1Yey avec l'EMD92 sur la mémoire spatiale.

Les données du test de l'OPP ont été analysées après 10 min et 14 min de test (**Figure 58**). L'ANOVA à deux facteurs (Génotype x Traitement) ne révèle aucun effet ni du génotype ($F_{1,52}=0.7950$ à 10 min ; $F_{1,52}=0.1699$ à 14 min), ni du traitement ($F_{1,52}=0.012$ à 10 min ; $F_{1,52}=0.094$ à 14 min). L'analyse du pourcentage d'exploration des objets par rapport au hasard (50%) met en évidence que les souris wt NT et T ainsi que Dp1Yey NT et T passent significativement plus de 50% du temps à explorer l'objet déplacé ($p < 0.05$ Do vs Fo à 10 et 14 min, One sample *t*-test). Comme les contrôles, les souris Dp1Yey NT et T différencient l'objet déplacé de l'objet non déplacé et ne présentent donc pas d'altération de la mémoire spatiale.

Le modèle Dp1Yey ne présentant pas de déficit spatial, l'effet de l'EMD92 sur cette mémoire ne peut donc pas être évaluée.

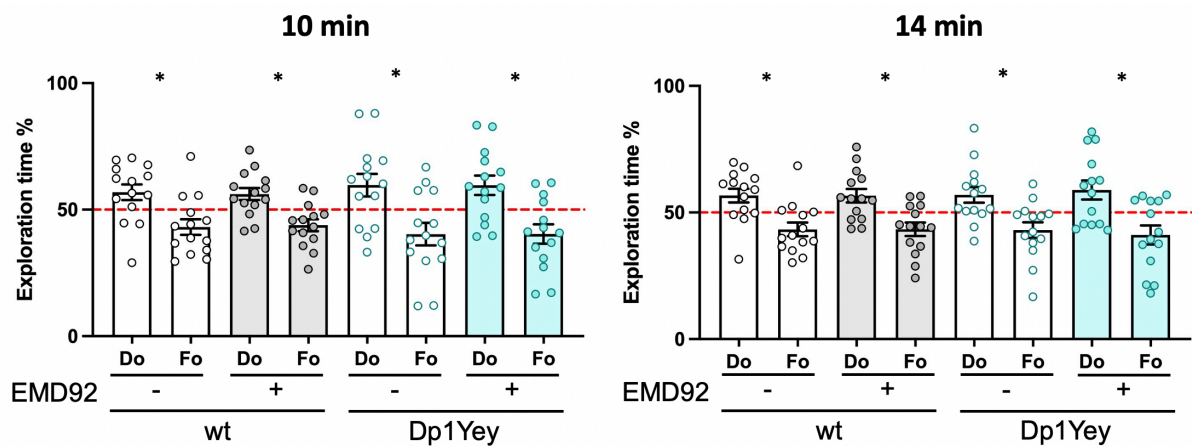


Figure 58 : Effet de l'EMD92 sur la mémoire spatiale des souris Dp1Yey sur 11 jours de traitement.

L'objet déplacé est noté Do et l'objet familier non déplacé est noté Fo. Après 10 et 14 min de test, le groupe Dp1Yey NT et T, comme les groupes wt, passent plus de 50% du temps à explorer le Do que le Fo. Les souris Dp1Yey ne présentent pas de déficit de la mémoire spatiale. Les valeurs représentent des moyennes ± erreur-type. Statistiques : * $p < 0.05$ vs hasard (50%) ; ns pour non significatif.

1.4 Mémoire de reconnaissance d'objet

Le test du NOP a été utilisé afin d'évaluer l'impact de l'EMD92 sur la mémoire de reconnaissance des souris Dp1Yey traitées.

L'ANOVA à deux facteurs (Génotype x Traitement) réalisé sur le pourcentage de temps d'exploration du nouvel objet ne montre aucun effet ni du génotype ($F_{1,52}=2.629$ à 10 min ; $F_{1,52}=2.105$ à 14 min), ni du traitement ($F_{1,52}=2.446$ à 10 min ; $F_{1,52}=3.347$ à 14 min). Cependant, une interaction Génotype x Traitement est mise en évidence avec l'ANOVA à deux facteurs à 10 min ($F_{1,52}=5.838 - p<0.05$) et 14 min ($F_{1,52}=5.875 - p<0.05$). Ainsi, les souris Dp1yey NT explorent significativement moins l'objet nouveau par rapport aux souris wt NT et Dp1Yey T.

Le pourcentage de temps d'exploration des objets a ensuite été comparé à 50% (hasard) après 10 min et 14 min de test (One sample *t*-test). Comme indiqué sur la **Figure 59**, les souris contrôles NT et T montrent une préférence pour l'objet nouveau par rapport au hasard, 50% ($p<0.05$ pour wt T et NT à 10 et 14 min). Comme cela était attendu, les souris Dp1Yey NT présentent un déficit de la mémoire de reconnaissance. En revanche, les souris Dp1Yey T explorent significativement plus de 50% du temps l'objet nouveau soulignant une correction de la mémoire de reconnaissance ($p<0.01$ à 10 et 14 min).

Ces résultats indiquent que le traitement à l'EMD92 permet également de rétablir la mémoire de reconnaissance chez le modèle souris Dp1Yey.

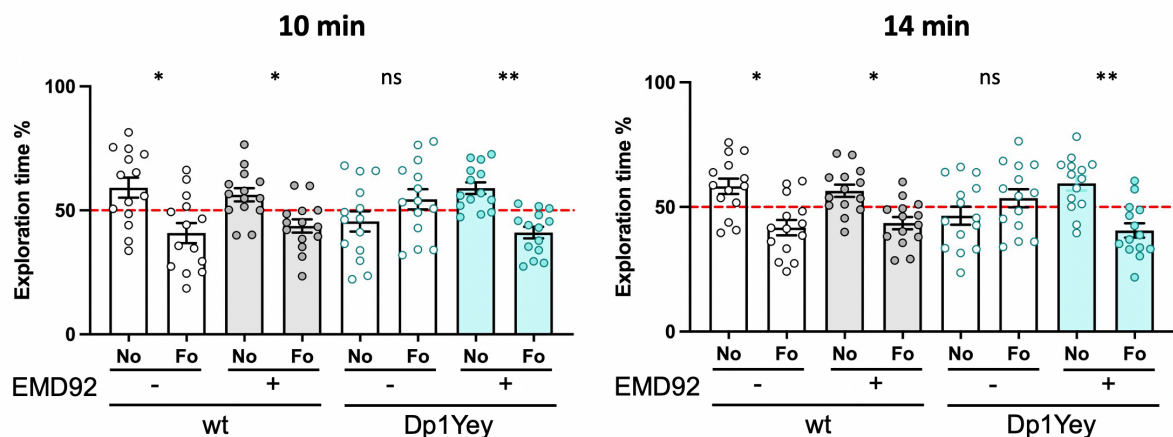


Figure 59 : Effet de l'EMD92 sur la mémoire de reconnaissance des souris Dp1Yey mesurée dans le test du NOP.

L'objet nouveau est noté No et l'objet familier est noté Fo. Après 10 et 14 min de test, un déficit de la mémoire de reconnaissance d'objet est observé chez les souris Dp1Yey NT alors que le groupe Dp1Yey T, comme les groupes wt, explorent plus de 50% du temps le No que le Fo. Les valeurs représentent des moyennes \pm erreur-type. Statistiques : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs hasard (50%) ; ns pour non significatif.

2. Impact de l'EMD92 sur l'activité cérébrale des souris Dp1Yey après 11 jours de traitements

Afin de mieux comprendre l'impact de l'inhibition de la kinase DYRK1A au niveau de l'activité cérébrale après un traitement aux Leucettinibs, une étude d'IRMf a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr. Laura Harsan du laboratoire iCUBE. Cette analyse d'imagerie cérébrale a permis dans un premier temps de caractériser le modèle Dp1Yey, puis d'évaluer l'effet du traitement de l'EMD92 sur l'activité cérébrale de ce modèle après 11 jours de traitements. Pour cela, la morphologie, la microstructure ainsi que la connectivité fonctionnelle cérébrale ont été évaluées chez les souris wt et Dp1Yey NT et T. Les effectifs sont les suivants : $n=14$ wt NT, $n=14$ wt T, $n=14$ Dp1Yey NT et $n=14$ Dp1Yey T.

La caractérisation du modèle souris Dp1Yey a été réalisée en comparant les résultats obtenus entre les groupes Dp1Yey NT et wt NT. L'analyse de la morphométrie basée sur le voxel révèle des altérations significatives du volume cortical et sous-cortical à l'échelle du cerveau dans le modèle Dp1Yey, impliquant le cortex frontal et sensoriel ainsi que les régions thalamiques, le striatum et l'hippocampe (**Figure 60A**). Le modèle Dp1Yey présente un élargissement significatif des ventricules (score $z = 7$) et une diminution du volume de l'hippocampe par rapport aux souris wt NT. De plus, la comparaison inter-groupes des cartes de diffusion paramétriques met en évidence une diminution significative de la FA (« *Fractional anisotropy* ») le long des voies de la substance blanche, y compris le corps calleux, la capsule externe et le faisceau cingulum chez les souris Dp1Yey (**Figure 60B**). La diminution de ce paramètre reflète une altération potentielle des fibres reliant des structures et donc de la connectivité fonctionnelle (Gunbey et al. 2017).

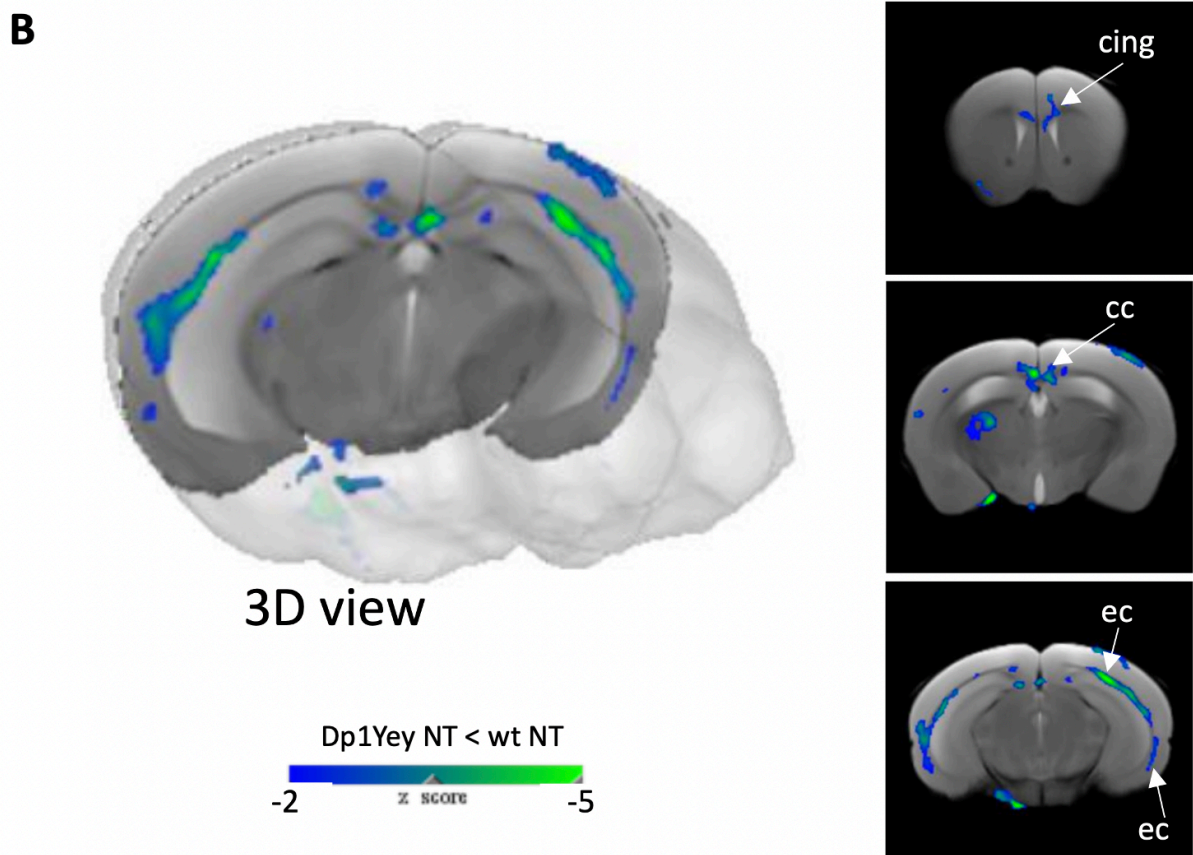
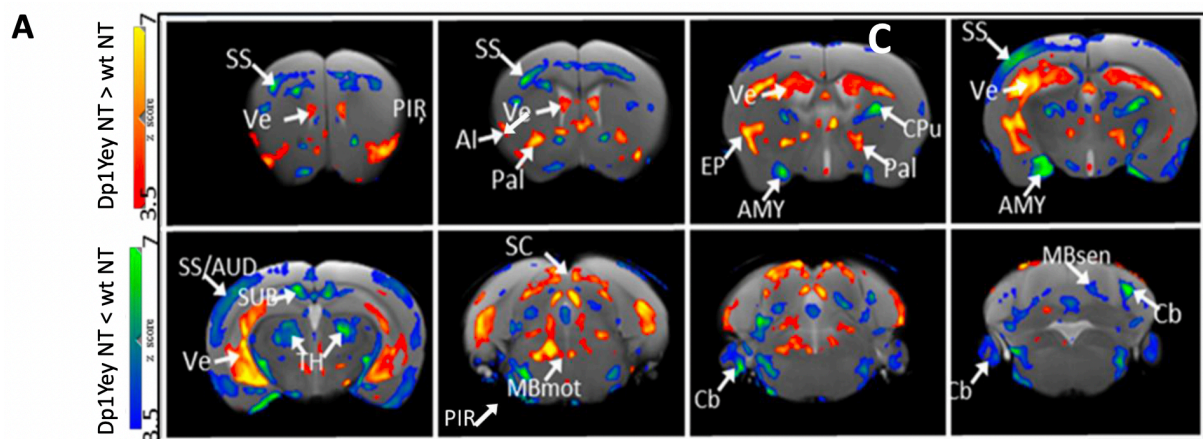


Figure 60 : Caractérisation de la morphologie cérébrale des souris Dp1Yey NT par rapport aux wt NT.

(A) Morphologie cérébrale du modèle Dp1Yey. Les cartes de déformation ont été obtenues par morphométrie basée sur le voxel et comparées entre les groupes wt NT et Dp1Yey NT par un test de Student (correction FDR $p < 0.01$). Une augmentation ou une diminution du volume cérébral significative (avec un z score entre 3,5 et 7) est indiquée par deux échelles : Dp1Yey

NT > wt NT = échelle rouge/jaune et Dp1Yey NT < wt NT = échelle bleue/verte. **(B)** Modifications de l'anisotropie fractionnaire chez les souris Dp1Yey NT. Des cartes FA paramétriques ont été obtenues et comparées entre le groupe wt NT et le groupe Dp1Yey NT. La vue 3D et les vues en coupe coronale montrent des diminutions significatives des valeurs FA chez les souris Dp1Yey NT pour un score z compris entre -3 et -5 (Dp1Yey NT < wt NT = échelle bleue/vert). cing : faisceau de cingulum ; cc : corps calleux ; ce : capsule externe.

S'agissant de l'effet de l'EMD92 sur les réseaux rs-fMRI, la théorie des graphes a été appliquée afin d'identifier les "nœuds" centraux, c'est-à-dire, les structures cérébrales, de chaque groupe expérimental (Farahani et al. 2019). La méthode « Stouffer » a été utilisée en tenant compte du nombre de connexions significatives pour chaque nœud et de la force de connexion permettant ainsi d'évaluer la connectivité fonctionnelle cérébrale (L.-C. Chang et al. 2013). Les souris Dp1Yey T présentent une diminution du coefficient/nœud de Stouffer par rapport au groupe Dp1Yey NT, suggérant une diminution globale de la connectivité fonctionnelle (**Figure 61**). Cette réduction de connectivité fonctionnelle est observée dans plusieurs régions du cerveau telles que le subiculum, l'hippocampe, le cortex cingulaire antérieur, l'hypothalamus ou encore le cortex somatosensoriel primaire. Les analyses révèlent uniquement des diminutions de l'activité fonctionnelles cérébrales, ainsi aucune augmentation n'est observée.

La diminution générale de la connectivité fonctionnelle causée par le traitement peut être comparée à l'amélioration des scores comportementaux obtenus par les Dp1Yey T avec l'EMD92. En effet, une modification de la connectivité fonctionnelle – chez les souris Dp1Yey T par rapport aux Dp1Yey NT – dans les structures cérébrales telles que l'hippocampe ou encore le subiculum qui sont impliquées dans la mémoire de reconnaissance des souris, peut expliquer la correction de la mémoire de reconnaissance des souris Dp1Yey avec l'EMD92 (E. H. Chang et Huerta 2012). Cependant, avant de confirmer une telle hypothèse, les études de la connectivité fonctionnelle doivent être finalisées par l'équipe du Dr. Harsan (iCUBE, Strasbourg, France). En effet, il faut vérifier l'impact du génotype sur la connectivité fonctionnelle chez les souris Dp1Yey NT par rapport aux wt NT, mais également évaluer l'effet de l'EMD92 sur la connectivité fonctionnelle des souris sauvages. Une fois toutes ces analyses terminées nous pourrons mieux comprendre les altérations qui sont ou ne sont pas corrigées par le traitement aux Leucettinibs

chez les souris Dp1Yey et vérifier que le traitement ne modifie pas la connectivité fonctionnelle des animaux sauvages.

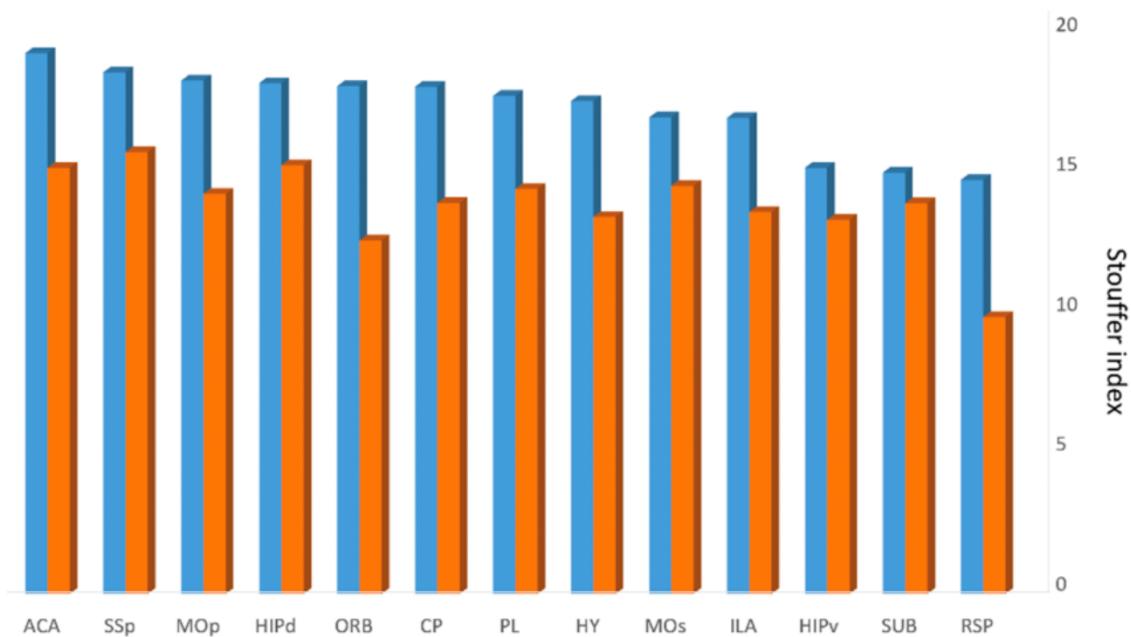


Figure 61 : Impact de l'EMD92 sur la connectivité fonctionnelle des souris Dp1Yey après 11 jours de traitements.

L'indice Stouffer montre les nœuds les plus significativement connectés (par nombre et force de leurs connexions) dans le groupe Dp1Yey NT en bleu et le groupe Dp1Yey T en orange (FDR corrigé $p < 0.01$). ACA : *Anterior cingulate* ; SSp : *Primary somatosensorial area* ; MOp : *Primary motor area* ; HIPd : *Dorsal hippocampus* ; ORB : *Orbital area* ; CP : *Caudate-putanem* ; PL : *Prelimbic area* ; HY : *Hypothalamus* ; MOs : *Secondary motor area* ; ILA : *Infralimbic area* ; HIPv : *Ventral hippocampus* ; SUB : *Subiculum* ; RSp : *Retrosplinal area*.

Pour conclure sur cette étude d'imagerie cérébrale, la morphométrie basée sur le voxel a révélé des altérations morphologiques à l'échelle du cerveau chez les souris Dp1Yey, tandis que l'analyse des IRM du tenseur de diffusion a souligné des changements de la connectivité des fibres de la substance blanche. De plus, la rs-fMRI a montré que l'inhibition pharmacologique de DYRK1A modifie la connectivité fonctionnelle des structures cérébrales liées à la mémoire chez les souris Dp1Yey.

3. Impact de l'EMD92 sur l'activité kinase de DYRK1A chez les souris Dp1Yey.

L'effet d'un traitement de 11 jours avec l'EMD92 sur l'activité catalytique de DYRK1A chez les souris Dp1Yey a été évalué par le dosage de l'activité de DYRK1A sur les extraits de demi-cerveaux de souris.

Les effectifs pour le dosage de l'activité de DYRK1A sont les suivants : wt NT n=8, wt-T n=8, Dp1Yey NT n = 8 et Dp1Yey T n = 8. L'ANOVA à deux facteurs (Génotype x Traitement) met en évidence un effet du génotype ($F_{1,28}=95.48 - p<0.0001$) et du traitement ($F_{1,28}=30.10 - p<0.0001$) sur le pourcentage d'activité kinase de DYRK1A (**Figure 62**). Comme attendu, les souris Dp1Yey NT présentent une augmentation de l'activité catalytique de DYRK1A ($p<0.0001$ wt NT vs Dp1Yey NT ; $p<0.0001$ wt T vs Dp1Yey NT). En revanche, une diminution significative de l'activité de DYRK1A est observée entre les groupes Dp1Yey NT et T ($p<0.0001$) reflétant une inhibition de DYRK1A avec l'EMD92.

L'EMD92 permet donc de diminuer l'activité catalytique de DYRK1A chez les souris Dp1Yey avec une dose de 0.3 mg/kg pendant 11 jours de traitement.

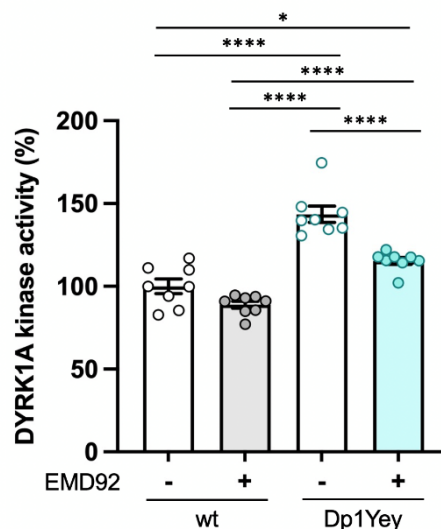


Figure 62 : Effet de l'EMD92 sur l'activité kinase de DYRK1A dans les extraits de cerveaux des souris Dp1Yey traitées pendant 11 jours.

L'activité kinase de DYRK1A est bien augmentée dans le groupe Dp1Yey NT par rapport aux groupes contrôles. Cependant, une diminution de l'activité de DYRK1A est observée dans le groupe Dp1Yey T par rapport au groupe Dp1Yey NT. Les valeurs représentent des moyennes \pm erreur-type. Statistiques : * $p<0.05$, **** $p<0.0001$.

V. Étude de l'EMD173 sur le modèle Dp1Yey pendant 11 jours de traitements

L'équipe du Dr. Laurent Meijer de chez Manros Therapeutics (Roscoff, France) a sélectionné l'une des Leucettinbs synthétisées pour passer sur les essais cliniques chez l'homme. Cette Leucettinb est l'EMD173. Dans ce projet, l'EMD173 a donc été testée sur le modèle souris Dp1Yey pendant 11 jours de traitements à deux doses différentes : 3 et 0.3 mg/kg/jour (**Figure 63**).

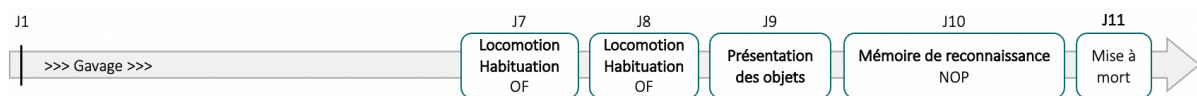


Figure 63 : Chronologie de l'étude de l'EMD173 sur le modèle Dp1Yey.

Pour cette dernière étude, les souris ont été quotidiennement traitées avec le troisième inhibiteur de DYRK1A, l'EMD173, pendant 11 jours (noté J sur la frise chronologique). Les tests comportementaux débutent au 7^{ème} jour de traitement avec deux jours de test OF. Le 9^{ème} jour correspond à la phase de présentation des objets et le test du NOP a été réalisé au 10^{ème} jour.

1. Effet de l'EMD173 sur les fonctions mnésiques des souris Dp1Yey pendant 11 jours de traitement

Pour cette dernière étude sur le modèle souris, les tests comportementaux sont réalisés à partir du 6^{ème} jour de traitement. Trois cohortes de souris ont été générées, chacune composées de quatre groupes d'animaux : un groupe wt et trois groupes Dp1Yey. Aucun effet néfaste des Leucettinbs testées n'ayant été observé, les souris contrôles n'ont pas été traitées. Les effectifs par groupes sont les suivants : n=16 wt NT (dont 8 mâles et 8 femelles), n=14 Dp1Yey NT (dont 8 mâles et 6 femelles), n=12 Dp1Yey traités à la dose de 0.3 mg/kg/jour, ci-après T-f (dont 6 mâles et 6 femelles) ainsi que n=14 Dp1Yey traités à la dose de 3 mg/kg/jour, ci-après T-F (dont 8 mâles et 6 femelles).

1.1 Activité locomotrice et habituation à l'arène des souris

L'ANOVA à trois facteurs (Génotype x Traitement x Sexe) ne montre pas d'effet significatif du sexe sur la distance parcourue au jour 1 et au jour 2 du test (respectivement $F_{1,48}=0,2657$ et $F_{1,48}=1,742$). Les résultats des souris mâles et femelles pour la distance parcourue ont donc été regroupés. Concernant l'analyse du jour 1, l'ANOVA à un facteur met en **évidence un effet du groupe** sur la distance parcourue au premier jour du test du champ ouvert ($F_{3,52}=4,082 - p<0,05$). Ainsi le test post-hoc montre une augmentation de la distance parcourue chez les souris Dp1Yey T-F par rapport aux souris contrôles, wt NT, reflétant une hyperactivité de ce groupe ($p<0,01$). L'ANOVA à un facteur réalisé sur la distance parcourue par les souris au cours du second jour du test ne montre aucun effet du groupe ($F_{3,52}=1,816$) (**Figure 64A**). La distance parcourue pour chacun des groupes au premier jour du test a été comparée à celle du deuxième jour afin de vérifier l'habituation des animaux au nouvel environnement (**Figure 64B**). L'ANOVA à deux facteurs (Groupe x Jour) montre un effet du jour pour chacun des groupes ($F_{1,52}=238,0 - p<0.0001$). En effet, une diminution de la distance parcourue est observée entre le jour 1 et le jour 2 pour chacun des groupes, reflétant une habituation des animaux à l'arène ($p<0.0001$ D1 vs D2).

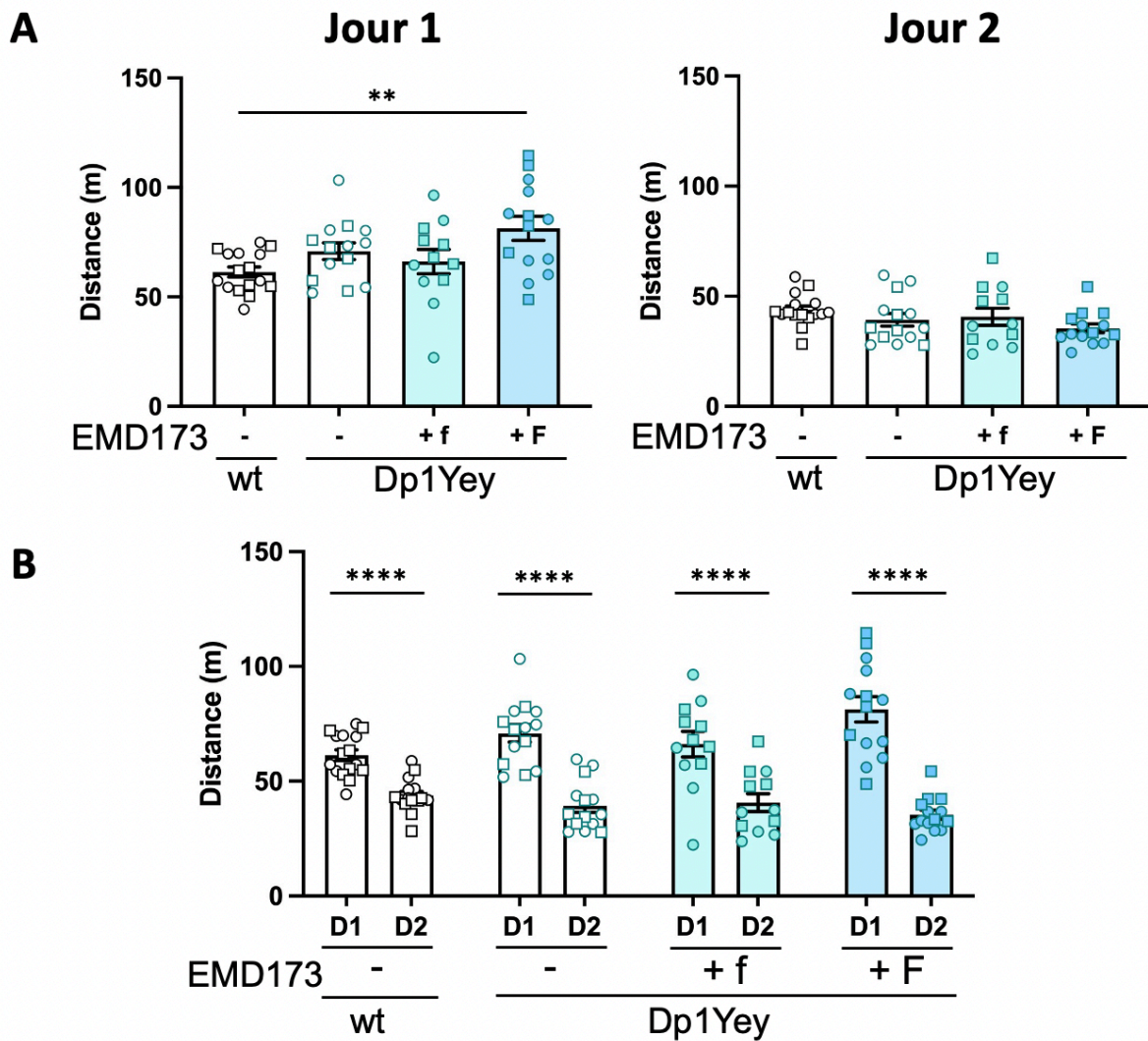


Figure 64 : Distance parcourue dans le test du champ ouvert chez les souris Dp1Yey traitées avec l'EMD173.

Les cercles et les carrés représentent respectivement les souris mâles et femelles. **(A)** Distance parcourue pendant les deux jours d'habitation. Au jour 1 du test, le groupe wt NT parcourt significativement moins de distance que le groupe Dp1Yey T-F, reflétant une hyperactivité de ce dernier. Au jour 2, aucune différence significative de la distance parcourue n'est observée entre les groupes. **(B)** Comparaison des distances parcourues entre le jour 1 et le jour 2. Tous les groupes étudiés parcourent moins de distance le deuxième jour du test que le premier. Les valeurs représentent des moyennes \pm erreur-type. Statistiques : ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

1.2 Mémoire de reconnaissance d'objet

Le test du NOP a été réalisé afin d'évaluer l'impact de la nouvelle molécule, l'EMD173, sur la mémoire de reconnaissance des souris Dp1Yey.

Comme toutes les études précédentes réalisées sur des souris mâles et femelles, un ANOVA à trois facteurs (Génotype X Traitement x Sexe) a été effectué dans le but de vérifier l'absence d'effet du sexe sur le pourcentage d'exploration de l'objet nouveau. Aucun effet du sexe n'a été observé ($F_{1,48}=0.8864$ à 10 min et $F_{1,48}=0.1491$ à 14 min). Pour la suite de l'analyse, les résultats des mâles et des femelles ont donc été réunis. Un ANOVA à un facteur a été réalisé sur le pourcentage de temps d'exploration du nouvel objet et met en évidence une différence significative entre les différents groupes à 10 ($F_{1,52}=4.758 - p<0.01$) et 14 min ($F_{1,52}=8.652 - p<0.0001$). Le test post-hoc révèle que les souris Dp1Yey NT explorent significativement moins l'objet nouveau que les souris wt NT ($p<0.05$ à 10 min et $p<0.01$ à 14 min), Dp1yey T-f ($p<0.05$ à 10 min et $p<0.001$ à 14 min) et Dp1Yey T-F ($p<0.05$ à 10 min et $p<0.001$ à 14 min).

Le pourcentage de temps d'exploration des objets a ensuite été comparé à 50% (hasard) après 10 min et 14 min de test (One sample *t*-test). Comme indiqué sur la **Figure 65**, les souris contrôles wt NT passent plus de 50% du temps d'exploration sur l'objet nouveau ($p<0.01$ pour wt NT à 10 et 14 min). Les souris Dp1Yey NT présentent un déficit de la mémoire de reconnaissance. En revanche, les souris Dp1Yey T-f et T-F explorent significativement plus de 50% du temps l'objet nouveau ($p<0.05$ et $p<0.001$ pour Dp1Yey T-f respectivement à 10 et 14 min ; $p<0.01$ et $p<0.001$ pour Dp1Yey T-F respectivement à 10 et 14 min).

L'EMD173 restaure donc la mémoire de reconnaissance chez le modèle souris Dp1Yey, et cela, aux deux doses étudiées : 3 mg/kg et 0.3 mg/kg.

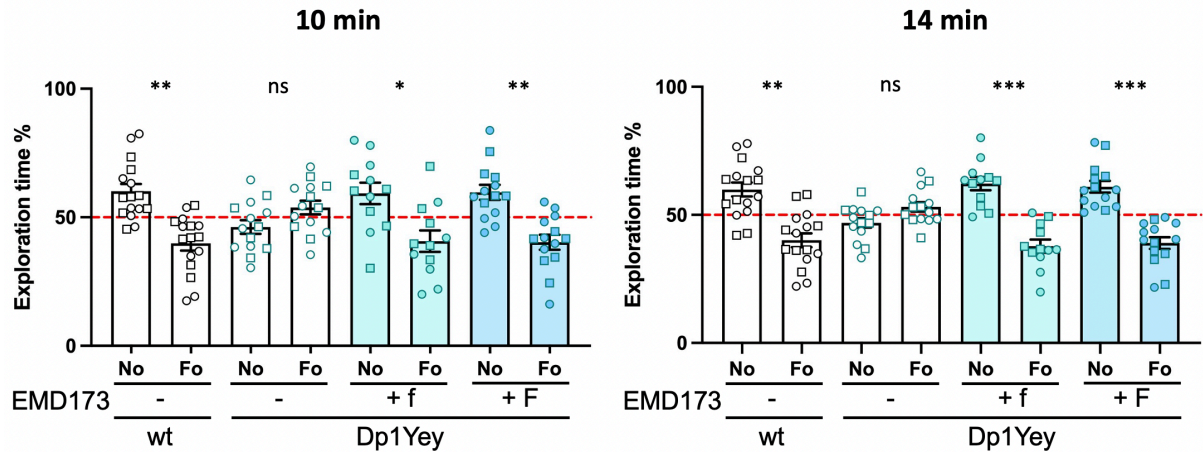


Figure 65 : Effet de l'EMD173 sur la mémoire de reconnaissance des souris Dp1Yey mesurée dans le test du NOP.

L'objet nouveau est noté No et l'objet familier est noté Fo. Les souris femelles sont représentées par des carrés et les mâles par des cercles. Après 10 et 14 min de test, un déficit de la mémoire de reconnaissance d'objet est observé chez les souris Dp1Yey NT alors que les groupes Dp1Yey T-f et T-F, comme le groupe wt, explorent plus de 50% du temps le No. Les valeurs représentent des moyennes \pm erreur-type. Statistiques : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs hasard (50%) ; ns pour non significatif.

2. Impact de l'EMD173 sur l'activité kinase de DYRK1A chez les souris Dp1Yey.

L'effet de l'EMD173 sur l'activité kinase de DYRK1A a été mesuré par le dosage de l'activité de DYRK1A et l'analyse de l'activité du kinome. Les deux expériences ont été réalisées sur les mêmes extraits d'un demi-cerveau de souris.

2.1 Activité catalytique de DYRK1A

Les effectifs pour le dosage de l'activité de DYRK1A sont les suivants : wt NT n=8, Dp1Yey NT n=8, Dp1Yey T-f n=8 et Dp1Yey T-F n=8. L'ANOVA à un facteur montre un effet significatif du groupe sur le pourcentage d'activité kinase de DYRK1A ($F_{3,28}=38.44 - p < 0.0001$) (Figure 66). Comme attendu, les souris Dp1Yey NT présentent une augmentation de l'activité catalytique

de DYRK1A ($p < 0.01$ wt NT vs Dp1Yey NT). En revanche, l'activité kinase de DYRK1A est augmentée chez les animaux Dp1Yey T-f et T-F par rapport aux souris wt-NT et Dp1Yey NT ($p < 0.0001$ wt NT vs Dp1Yey T-f et T-F ; $p < 0.001$ Dp1Yey NT vs Dp1Yey T-f et T-F).

Les résultats suggèrent donc que l'EMD173 ne permet pas de diminuer l'activité catalytique de DYRK1A chez les souris Dp1Yey après 11 jours de traitement à une dose de 3 ou de 0.3 mg/kg.

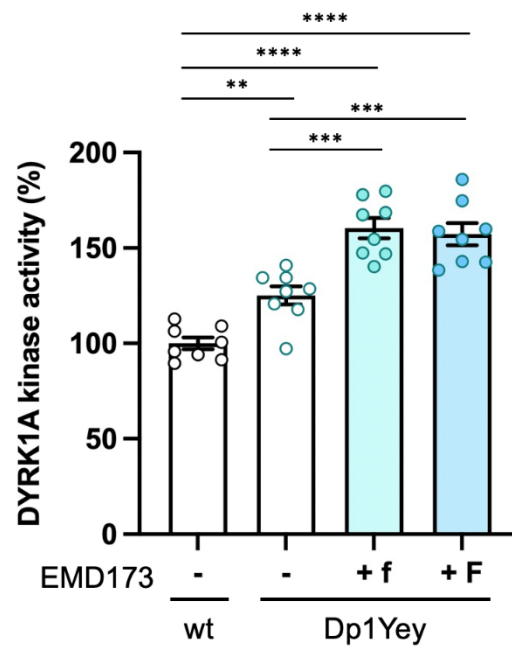


Figure 66 : Effet de l'EMD173 sur l'activité kinase de DYRK1A dans les extraits de cerveaux des souris Dp1Yey traitées pendant 11 jours.

L'activité kinase de DYRK1A est bien augmentée dans le groupe Dp1Yey NT par rapport au groupe contrôle wt NT. Cependant, une augmentation du dosage kinase de DYRK1A est observée dans les groupes Dp1Yey T-f et T-F en comparaison aux groupes wt NT et Dp1Yey NT. Les valeurs représentent des moyennes \pm erreur-type. Statistiques : ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

2.2 Profil d'activité du kinome

La technologie micropuce peptidique PamChip permet de mesurer l'activité des kinases dans les extraits protéiques des souris wt NT ainsi que Dp1Yey NT, T-f et T-F. Les effectifs par groupe sont les suivants : $n=6$ wt NT, $n=6$ Dp1Yey NT, $n=6$ Dp1Yey T-f et $n=6$ Dp1Yey T-F.

L'analyse de l'activité de DYRK1A a été réalisée comme pour l'étude de l'EMD10 chez les souris Tg(*Dyrk1a*) pendant 10 jours de traitements. Les kinases dont l'activité est modifiée d'un groupe à l'autre ont été sélectionnées au-dessus du seuil de 1.2 pour leur score final médian. Dans ce projet, aucune activité de DYRK1A n'a été détectée avec le système PamChip, son score final médian ne dépassant pas le seuil de significativité (1.2). Cela suggère que l'activité de DYRK1A ne serait pas modifiée entre nos différents groupes. Ces résultats vont dans le sens contraire de ceux du dosage d'activité kinase de DYRK1A dans notre étude et ainsi de ceux des études du Dr. Nguyen (Nguyen et al., 2018). En effet, même si le traitement aux Leucettinibs ne modifie pas l'activité kinase de DYRK1A, une augmentation de son activité devrait être observée chez les souris Dp1Yey NT par rapport aux contrôles (Nguyen et al., 2018).

L'analyse de l'activité du kinome a tout de même pu identifier des différences significatives entre les groupes au niveau de la phosphorylation de phosphosites par d'autres kinases. Un test de comparaisons multiples de traitements par rapport à un contrôle (« *Multiple Test conditions versus Control* ») a été réalisé et met en évidence une activation dans les extraits du groupe Dp1Yey NT par rapport au groupe wt NT (**Figure 67**). En effet, un total de 55 kinases sont régulées à la hausse chez les souris Dp1Yey NT : ANP α ; PAK1 de la famille STE ; CK1 α de la famille CK1 ; 12 kinases de la famille des CMGC dont IKK α et IKK ϵ ; 14 kinases de la famille des CAMK dont RSK2-B, RSK-3B ainsi que MSK1-B ; 24 kinases de la famille des AGC dont PKG2, PKGT, PKA α , AURA/AUR2 et les PKC. Chez les souris Dp1Yey, l'augmentation d'activité du kinome concernent majoritairement les kinases de la famille des CMCG, des AGC ainsi que des CAMK.

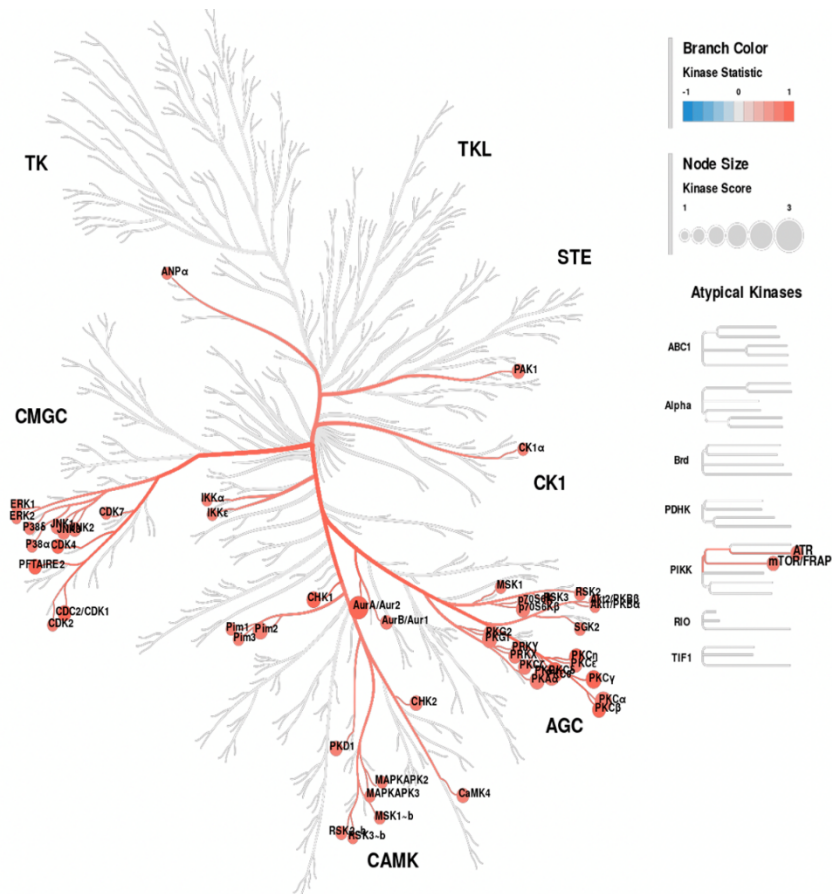


Figure 67 : Profil d'activité du kinome chez les souris Dp1Yey NT en comparaison aux souris wt NT.

La coloration indique la taille et la direction de l'effet (bleu : diminution de l'activité de la kinase ; et rouge : augmentation de l'activité de la kinase), et la taille du cercle indique le score de spécificité de la kinase, c'est-à-dire le classement de la kinase dans l'analyse d'activité des kinases les plus modifiées d'un groupe à l'autre. Une activation de nombreuses kinases est visible dans les extraits des souris Dp1Yey NT par rapport aux wt NT.

Concernant l'analyse des groupes Dp1Yey T-f et T-F par rapport au groupe Dp1Yey NT, les résultats montrent une diminution de l'activité de 8 kinases de la famille AGC sur les 24 dont l'activité est augmentée chez les souris Dp1Yey (Figure 68A). Ainsi, le traitement à l'EMD92 entraîne donc une diminution de l'activité de 33% des kinases de la famille AGC chez les souris Dp1Yey. À l'exception de la kinase PIM2 dont l'activité est diminuée avec le traitement à forte dose chez les souris Dp1Yey (Figure 68B), l'activité des kinases de la famille CAMK et CMGC

n'apparaît pas dans les comparaisons Dp1Yey T-f vs Dp1yey NT et Dp1Yey T-F vs Dp1yey NT. Cela suggère donc que leur activité n'est pas impactée par le traitement. Une comparaison des résultats des souris Dp1Yey T-f ou T-f par rapport aux souris wt NT permettrait de vérifier si l'activité de ses kinases est toujours augmentée.

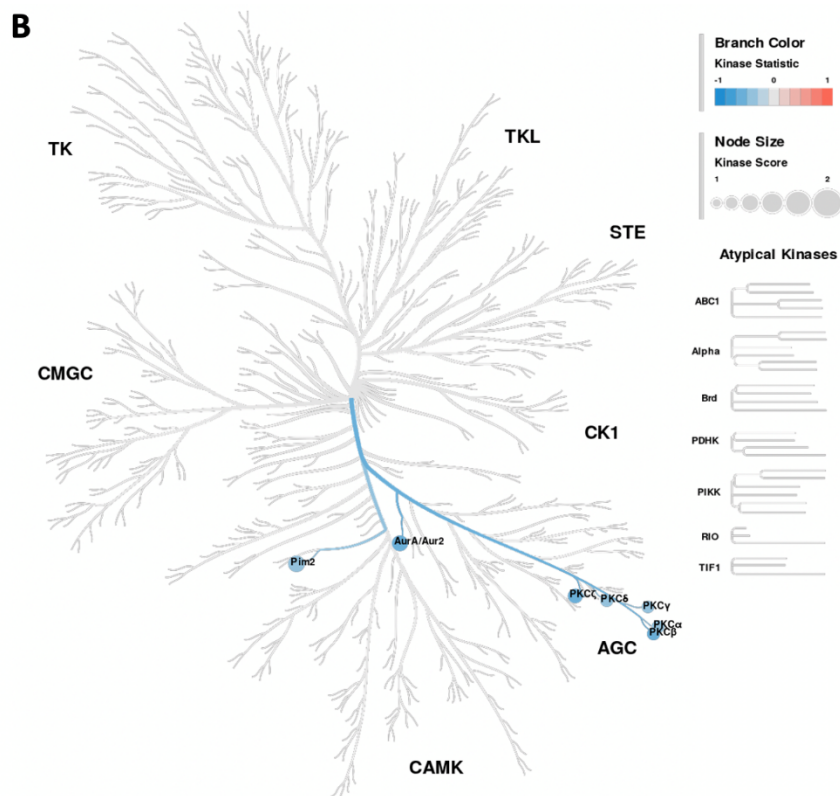
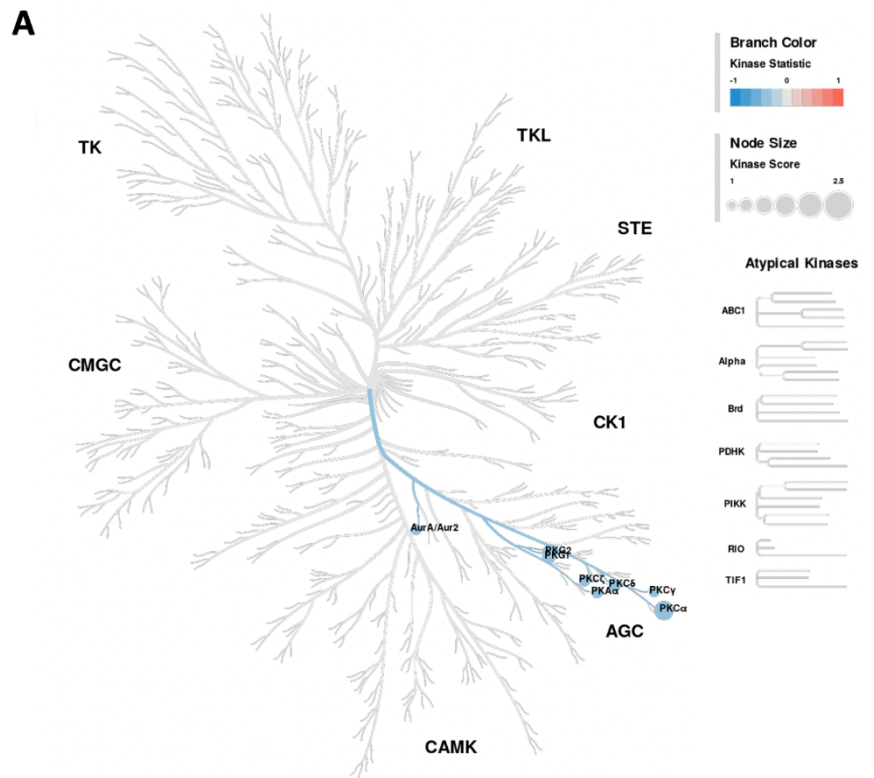


Figure 68 : Profil d'activité du kinome chez les souris Dp1Yey T en comparaison aux souris Dp1Yey NT.

La coloration indique la taille et la direction de l'effet (bleu : diminution de l'activité de la kinase ; et rouge : augmentation de l'activité de la kinase), et la taille du cercle indique le score de spécificité de la kinase, c'est-à-dire le classement de la kinase dans l'analyse d'activité des kinases les plus modifiées d'un groupe à l'autre. **(A)** Comparaison Dp1Yey T-f vs Dp1Yey NT. Une diminution de l'activité des kinases de la famille AGC est observée dans les extraits des souris Dp1Yey T-f par rapport aux Dp1Yey NT. **(B)** Comparaison Dp1Yey T-F vs Dp1Yey NT. Une diminution de l'activité des kinases de la famille AGC mais aussi de la kinase PIM2 de la famille des CAMK, est observée dans les extraits des souris Dp1Yey T-f par rapport aux Dp1Yey NT.

Les CAMK sont activées par une augmentation de la concentration d'ions calcium intracellulaires (Ca^{2+}) et de calmoduline. Les CAMK sont impliquées dans la régulation de l'expression des gènes via la phosphorylation de facteurs de transcription. Ces kinases régulent également la mort cellulaire programmée, le réarrangement du réseau cytosquelettique de la cellule et les mécanismes impliqués dans l'apprentissage et la mémoire d'un organisme (Swulius et Waxham 2008).

L'étude de l'activité du kinome ne permet pas de confirmer les résultats du dosage de l'activité kinase de DYRK1A. En revanche, ces résultats confirment une activation des kinases principalement de la famille AGC lors de la comparaison du kinome entre le groupe Dp1Yey NT et le groupe contrôle, wt NT. De plus, le traitement à l'EMD173 permet l'inhibition de cette activation chez les souris Dp1Yey traitées avec une dose de 3 et de 0.3 mg/kg pendant 11 jours.

VI. Étude de l'EMD173 sur les modèles rats du SD pendant 12 à 13 jours de traitements

Dans le but de permettre une meilleure translation du candidat médicamenteux de l'animal vers l'homme, la Leucettinb sélectionnée pour passer sur l'essai clinique a ensuite été étudiée sur une autre espèce, le rat. L'EMD173 a donc été étudié sur les modèles rats du SD de notre laboratoire : le modèle présentant une T21 partielle, Dup(Rno11)-APP^{H3} et le modèle complet de la T21, Dup(Rno11-20)-APP^{H3}. Ces deux modèles rats du SD présentent tous deux une trisomie du gène *Dyrk1a* localisée sur le Rno11 et des déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale dans le test de la piscine de Morris (en anglais « *Morris water maze* »). L'effet du traitement sur les capacités cognitives des rats trisomiques a donc été mesuré avec le test de la piscine de Morris. Ce test étant plus long à réaliser dans le temps, la durée du traitement des modèles rats du SD a été prolongée de deux à trois jours par rapport au modèle souris Dp1Yey. Le traitement a donc été réalisé sur 12 à 13 jours à une dose de 0.5 mg/kg/jour comme suggéré par l'équipe du Dr. Laurent Meijer. La chronologie de l'étude est détaillée dans le **Figure 69**.

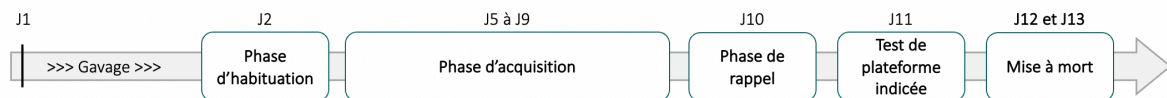


Figure 69 : Chronologie de l'étude de l'EMD173 sur les modèles rats du SD.

Les rats ont été quotidiennement traités avec l'EMD173 durant 12 à 13 jours (noté J sur la frise chronologique). Le test de la piscine de Morris débute au 2^{ème} jour de traitement avec la phase d'habituatation. Au 5^{ème} jour de l'étude commence la phase d'acquisition du test qui est réalisée sur 5 jours consécutifs. Le test de rappel est réalisé le lendemain du dernier jour d'acquisition. Le test de la piscine de Morris se termine au 11^{ème} jour de l'étude avec le test de la plateforme indicée. Les animaux sont mis à mort les deux derniers jours de l'étude.

1. Effet de l'EMD173 sur les fonctions mnésiques des modèles rats du SD

Le test de la piscine de Morris permet de mesurer l'apprentissage et la mémoire spatiale à long terme de nos animaux. Pour cette étude, un total de cinq cohortes rats a été généré et chaque cohorte est constituée de six groupes qui se différencient par leur génotype – rats APP^{H2}, Dup(Rno11)-APP^{H3} et Dup(Rno11-20)APP^{H3} – et le traitement, NT ou T. Les effectifs par groupe sont les suivants : n=24 APP^{H2} NT (dont 12 mâles et 12 femelles), n=24 APP^{H2} T (dont 12 mâles et 12 femelles), n=23 Dup(Rno11)-APP^{H3} NT (dont 11 mâles et 12 femelles), n=24 Dup(Rno11)-APP^{H3} T (dont 12 mâles et 12 femelles), n=23 Dup(Rno11-20)APP^{H3} NT (dont 12 mâles et 11 femelles) et n=24 Dup(Rno11-20)APP^{H3} T (dont 13 mâles et 11 femelles).

Le test de la piscine de Morris a été réalisé en deux étapes, la phase d'acquisition permettant d'évaluer les capacités d'apprentissage spatial ainsi que le test de rappel pour mesurer la mémoire spatiale des rats.

1.1 Phase d'acquisition

La phase d'acquisition réalisée sur cinq jours débute au 5^{ème} jour du traitement. Au cours de cette phase, les paramètres mesurés sont la distance parcourue, la vitesse de nage ainsi que la latence pour atteindre la plateforme.

L'ANOVA à trois facteurs (Génotype x Traitement x Sexe) réalisé ne montre aucun effet significatif du sexe sur la distance parcourue ($F_{1,130}=1.352$), la latence pour atteindre la plateforme ($F_{1,130}=1.352$) et la vitesse de nage ($F_{1,130}=0.0004$). Les données des rats mâles et femelles ont donc été réunies pour l'analyse.

Concernant la distance parcourue, l'ANOVA à deux facteurs sur des mesures répétées (Groupe x Jour) révèle un effet du jour ($F_{4,544}=125.0$ – $p<0.0001$) et du groupe ($F_{5,136}=13.37$ – $p<0.0001$) (**Figure 70A**). L'effet du jour s'explique par la diminution de la distance parcourue au cours des jours d'apprentissage de la localisation de la plateforme. L'ensemble des rats apprennent donc la localisation de la plateforme. Cependant, l'effet du génotype observé avec l'ANOVA à deux facteurs montre que les animaux Dup(Rno11)-APP^{H3} (NT et T) et Dup(Rno11-20)-APP^{H3} (NT et T) parcourent une plus grande distance que les rats contrôles pour atteindre la plateforme au cours de l'acquisition.

L'ANOVA à deux facteurs sur des mesures répétées (Groupe x Jour) sur la latence pour atteindre la plateforme met en évidence des résultats similaires à ceux de la distance parcourue (**Figure 70B**). Un effet du jour est observé chez tous les groupes avec une diminution de la latence au cours de l'apprentissage reflétant que tous rats apprennent la localisation de la plateforme ($F_{4,544}=100.7 - p<0.0001$). En revanche, l'ANOVA à deux facteurs souligne aussi une augmentation de la latence chez les rats Dup(Rno11)-APP^{H3} (NT et T) et Dup(Rno11-20)-APP^{H3} (NT et T) par rapport aux rats contrôles APP^{H3} (NT et T) (effet du groupe, $F_{5,136}=28.40 - p<0.0001$).

L'analyse statistique (ANOVA à deux facteurs sur des mesures répétées, Groupe x Jour) souligne un effet du jour ($F_{4,544}=123.2 - p<0.0001$). Tous les rats présentent donc une diminution de la vitesse de nage au cours des jours d'apprentissage (**Figure 70C**). Un effet du groupe est aussi observé ($F_{5,136}=4.144 - p<0.0001$). Ainsi, le test post-hoc montre une réduction de la vitesse de nage des rats Dup(Rno11-20)-APP^{H3} T par rapport aux rats APP^{H2} NT au jour 3 ($p<0.05$), jour 4 ($p<0.05$) et jour 5 ($p<0.001$).

Un retard d'apprentissage spatial des rats Dup(Rno11)-APP^{H3} (NT et T) et Dup(Rno11-20)-APP^{H3} (NT et T) est observé grâce à l'analyse de la distance parcourue et de la latence pour atteindre la plateforme. Le traitement à l'EMD173 ne permet pas de corriger le déficit d'apprentissage spatial de ces deux modèles rats du SD.

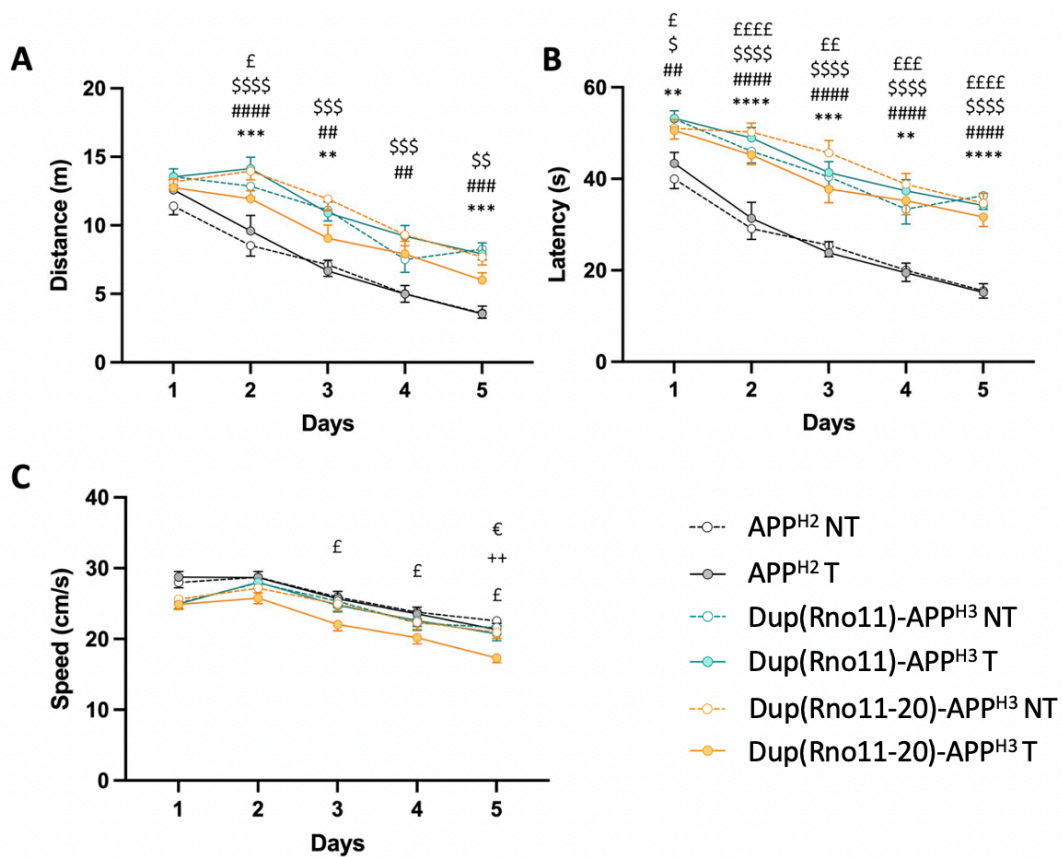


Figure 70 : Effet de l'EMD173 sur l'apprentissage spatial des rats Dup(Rno11)-APP^{H3} et Dup(Rno11-20)-APP^{H3}.

(A) La distance parcourue pour atteindre la plateforme lors de l'acquisition. Les groupes Dup(Rno11)-APP^{H3} (NT et T) et Dup(Rno11-20)-APP^{H3} (NT et T) présentent un déficit d'apprentissage spatial. (B) La latence pour atteindre la plateforme au cours de l'apprentissage. Les rats Dup(Rno11)-APP^{H3} et Dup(Rno11-20)-APP^{H3} traités ou non traités avec l'EMD173 prennent plus de temps pour atteindre la plateforme confirmant leur déficit d'apprentissage. (C) La vitesse de nage des rats lors de la phase d'acquisition. Seuls les rats Dup(Rno11-20)-APP^{H3} T ont une réduction de leur vitesse de nage par rapport au groupe contrôle APP^{H3} NT. Les valeurs représentent des moyennes \pm erreur-type. Statistiques : ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ APP^{H2} NT vs Dup(Rno11)-APP^{H3} NT ; ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$, #### $p < 0.0001$ APP^{H2} NT vs Dup(Rno11)-APP^{H3} T ; \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$, \$\$\$ $p < 0.001$, \$\$\$\$ $p < 0.0001$ APP^{H2} NT vs Dup(Rno11-20)-APP^{H3} NT ; £ $p < 0.05$, ££ $p < 0.01$, £££ $p < 0.001$, ££££ $p < 0.0001$ APP^{H2} NT vs Dup(Rno11-20)-APP^{H3} T ; ++ $p < 0.01$ Dup(Rno11)-APP^{H3} NT vs Dup(Rno11-20)-APP^{H3} T ; € $p < 0.05$ Dup(Rno11-20)-APP^{H3} NT vs Dup(Rno11-20)-APP^{H3} T

NT vs Dup(Rno11-20)-APP^{H3} NT ; £ $p < 0.05$, ££ $p < 0.01$, £££ $p < 0.001$, ££££ $p < 0.0001$ APP^{H2} NT vs Dup(Rno11-20)-APP^{H3} T ; ++ $p < 0.01$ Dup(Rno11)-APP^{H3} NT vs Dup(Rno11-20)-APP^{H3} T ; € $p < 0.05$ Dup(Rno11-20)-APP^{H3} NT vs Dup(Rno11-20)-APP^{H3} T

1.2 Phase de rappel

La phase de rappel du test de la piscine de Morris a été réalisée au 10^{ème} jour de notre protocole de traitement. Ce test permet d'évaluer la mémoire spatiale à long terme des rats en analysant le pourcentage de temps passé dans le quadrant cible, c'est-à-dire le quadrant NE où était localisée la plateforme au cours de la phase d'acquisition. La vitesse de nage et le nombre de croisements de la plateforme sont aussi étudiés.

L'ANOVA à trois facteurs (Génotype x Traitement x Sexe) ne montre aucun effet du sexe sur la vitesse de nage ($F_{1,130}=0.3440$), le nombre de croisements de la plateforme ($F_{1,130}=1.198$) et le pourcentage de temps passé dans le quadrant cible ($F_{1,130}=0.1818$). Les résultats des rats mâles et des femelles ont donc été réunis pour les analyses statistiques présentées ci-dessous (**Figure 71A**).

L'analyse de la vitesse de nage des rats avec un ANOVA à deux facteurs (Génotype x Traitement) met en évidence un effet du génotype ($F_{1,130}=26.81 - p<0.0001$). Ainsi les rats Dup(Rno11)-APP^{H3} et Dup(Rno11-20)-APP^{H3} (NT et T) ont une vitesse de nage plus faible que les rats contrôles APP^{H2} (NT ou T) ($p<0.001$ APP^{H2} NT vs Dup(Rno11)-APP^{H3} NT et T ; $p<0.01$ APP^{H2} NT vs Dup(Rno11-20)-APP^{H3} NT ; $p<0.0001$ APP^{H2} NT vs Dup(Rno11-20)-APP^{H3} T).

L'ANOVA à deux facteurs (Génotype x Traitement) sur le pourcentage de temps passé dans le quadrant cible souligne un effet du génotype ($F_{1,130}=20.34 - p<0.0001$) (**Figure 71B**). En effet, les animaux Dup(Rno11)-APP^{H3} et Dup(Rno11-20)-APP^{H3} (NT et T) passent significativement moins de temps dans le quadrant cible par rapport aux rats APP^{H2} (NT ou T) ($p<0.001$ APP^{H2} NT vs Dup(Rno11)-APP^{H3} NT ; $p<0.0001$ APP^{H2} NT vs Dup(Rno11-20)-APP^{H3} NT ; $p<0.001$ APP^{H2} T vs Dup(Rno11)-APP^{H3} T ; $p<0.05$ APP^{H2} T vs Dup(Rno11-20)-APP^{H3} T). L'analyse du pourcentage de temps passé dans le quadrant cible par rapport au hasard (ici 25%) avec le One sample *t*-test confirme que les rats APP^{H2} (NT et T) se souviennent dans quel quadrant était localisé la plateforme ($p<0.0001$). Les rats Dup(Rno11)-APP^{H3} NT et T ainsi que les rats Dup(Rno11-20)-APP^{H3} NT ne passent pas significativement plus de 25% du temps dans le quadrant NE, reflétant ainsi un déficit de leur mémoire spatiale à long terme. En revanche, comme les groupes contrôles, le groupe Dup(Rno11)-APP^{H3} T passe significativement plus de

25% du temps dans le quadrant NE, donc ces animaux se souviennent de la localisation de la plateforme ($p < 0.05$).

Concernant le nombre de croisements de l'ancien emplacement de la plateforme, le test Kruskal-Wallis souligne une différence significative entre les groupes ($p < 0.0001$) (**Figure 71C**). Le test post-hoc révèle que les animaux Dup(Rno11)-APP^{H3} et Dup(Rno11-20)-APP^{H3} (NT et T) croisent l'ancienne localisation de la plateforme significativement moins que les rats APP^{H2} (NT ou T) ($p < 0.05$ APP^{H2} NT vs Dup(Rno11)-APP^{H3} NT et T ; $p < 0.01$ APP^{H2} NT vs Dup(Rno11-20)-APP^{H3} NT ; $p < 0.05$ APP^{H2} NT vs Dup(Rno11-20)-APP^{H3} T ; $p < 0.01$ APP^{H2} T vs Dup(Rno11)-APP^{H3} NT et T ; $p < 0.001$ APP^{H2} T vs Dup(Rno11-20)-APP^{H3} NT ; $p < 0.01$ APP^{H2} T vs Dup(Rno11)-APP^{H3} T). Contrairement aux rats contrôles, les rats Dup(Rno11)-APP^{H3} et Dup(Rno11-20)-APP^{H3} NT ou T ne se souviennent pas de l'exacte localisation de la plateforme dans le quadrant NE. La précision de la mémoire spatiale des rats modèles de T21, NT ou T est donc réduite.

L'EMD173 ne permet pas de corriger le déficit d'apprentissage et de mémoire spatiale à long terme chez les rats Dup(Rno11)-APP^{H3}. Cependant, même si la mémoire spatiale des rats Dup(Rno11-20)-APP^{H3} traités avec l'EMD173 n'est pas équivalente à celles des rats contrôles, il semblerait que l'EMD173 permette une amélioration des capacités de mémorisation spatiale de ces rats.

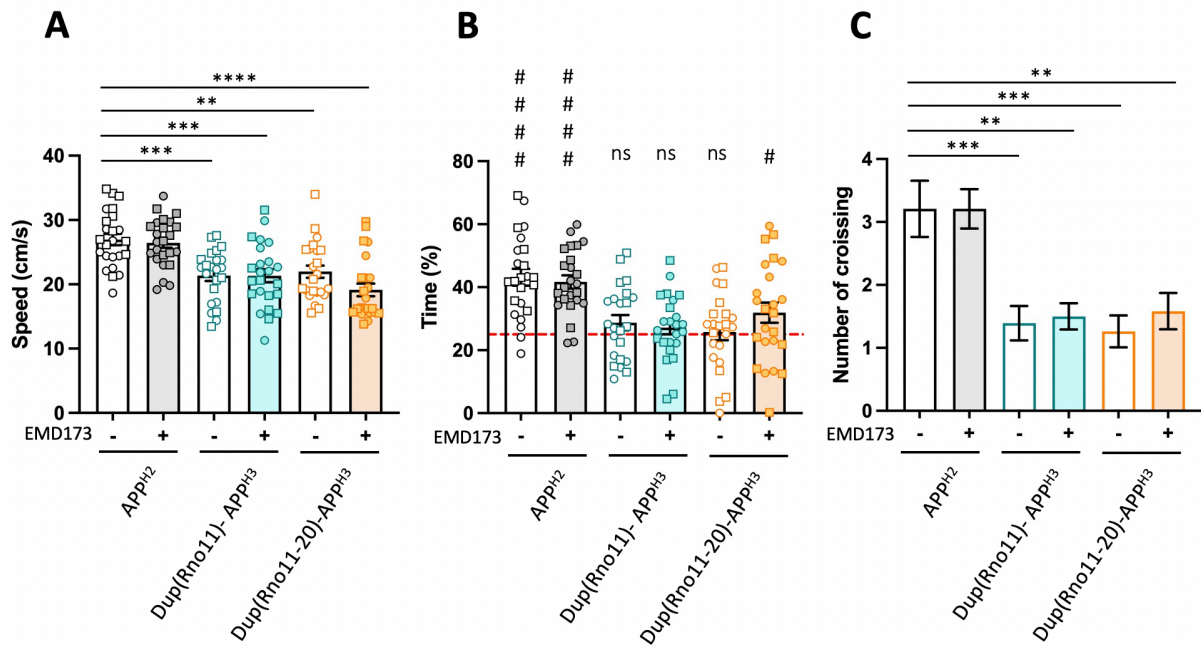


Figure 71 : Effet de l'EMD173 sur la mémoire spatiale des rats Dup(Rno11)-APP^{H3} et Dup(Rno11-20)-APP^{H3} au cours du test de rappel de la piscine de Morris.

Les rats mâles et femelles sont représentés respectivement par des cercles et des carrés. **(A)** Vitesse de nage des rats. Les rats Dup(Rno11)-APP^{H3} et Dup(Rno11-20)-APP^{H3} NT et T ont une vitesse de nage réduite par rapport aux animaux contrôles. **(B)** Pourcentage de temps passé dans le quadrant cible, NE. Les rats Dup(Rno11)-APP^{H3} NT et T ainsi que les rats Dup(Rno11-20)-APP^{H3} NT ne passent pas significativement plus de 25% du temps dans le quadrant cible, ces rats présentent donc un déficit de la mémoire spatiale. En revanche, les rats Dup(Rno11-20)-APP^{H3} T comme les groupes contrôles (NT et T) passent plus de 25% du temps dans le quadrant cible reflétant une correction de leur mémoire spatiale suite à l'administration de l'EMD173. **(C)** Nombre de croisement de l'emplacement de la plateforme. Les rats Dup(Rno11)-APP^{H3} et Dup(Rno11-20)-APP^{H3} NT et T croisent significativement moins souvent la plateforme que les rats contrôles, reflétant une réduction de la précision de leur mémoire spatiale.

Statistiques : ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ et pour le pourcentage de temps passé dans le quadrant cible (C) # $p < 0.05$, ##### $p < 0.0001$ vs. hasard (25%).

2. Impact de l'EMD173 sur l'activité kinase de DYRK1A dans les modèles rats du SD

L'effet de l'EMD173 sur l'activité kinase de DYRK1A a été mesuré par le dosage de l'activité de DYRK1A et l'analyse de l'activité du kinome. Les deux expériences ont été réalisées sur les mêmes extraits d'un demi-cerveau de souris. L'analyse du profil d'activité du kinome est en cours et ne sera donc pas présenté dans ce manuscrit.

Concernant le dosage d'activité de DYRK1A, les effectifs sont les suivants : APP^{H2} NT n=12, APP^{H2} T n=12, Dup(Rno11)-APP^{H3} NT n=12, Dup(Rno11)-APP^{H3} T n=12, Dup(Rno11-20)-APP^{H3} NT n=12 et Dup(Rno11-20)-APP^{H3} T n=12. L'ANOVA à deux facteurs (Génotype x Traitement) met en évidence un effet significatif du génotype sur le pourcentage d'activité kinase de DYRK1A ($F_{2,68}=8.150 - p<0.001$) (**Figure 72**). Ainsi, une augmentation de l'activité catalytique de DYRK1A est observée chez les rats Dup(Rno11)-APP^{H3} et Dup(Rno11-20)-APP^{H3} par rapport aux contrôles APP^{H2} NT ($p<0.01$ APP^{H2} NT vs Dup(Rno11)-APP^{H3} NT, $p<0.05$ APP^{H2} NT vs Dup(Rno11-20)-APP^{H3} NT). De plus, les modèles rats du SD traités avec l'EDM173 présentent aussi une augmentation de l'activité catalytique de DYRK1A par rapport aux APP^{H2} NT, l'EMD173 n'impact donc pas l'activité de DYRK1A dans ces modèles ($p<0.01$ APP^{H2} NT vs Dup(Rno11)-APP^{H3} T, $p<0.05$ APP^{H2} NT vs Dup(Rno11-20)-APP^{H3} T).

L'activité kinase de DYRK1A chez les rats Dup(Rno11)-APP^{H3} et Dup(Rno11-20)-APP^{H3} présentant une trisomie du gène *Dyrk1a* localisé sur le Rno11, n'avait pas encore été analysée. Ces résultats montrent une augmentation de l'activité kinase de DYRK1A chez les deux modèles rats. En revanche, l'EMD173 à une dose de 0.5 mg/kg/jour pendant 12 ou 13 jours de traitements ne permet pas de normaliser l'activité catalytique de DYRK1A chez les rats Dup(Rno11)-APP^{H3} et Dup(Rno11-20)-APP^{H3}.

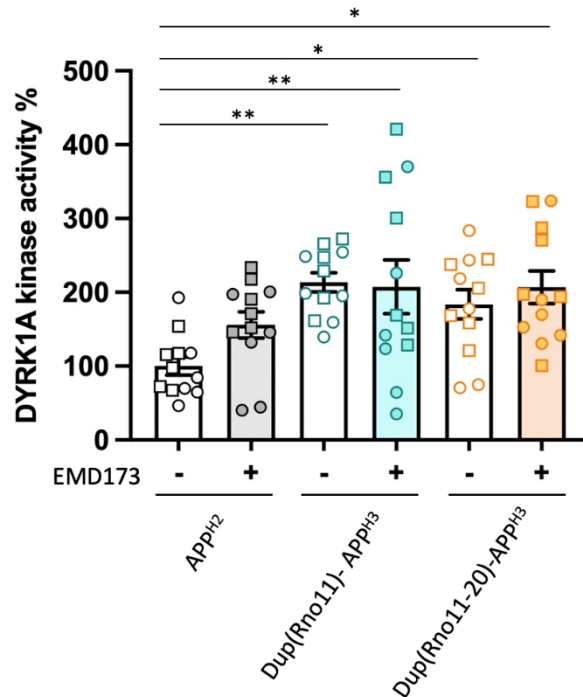


Figure 72 : Effet de l'EMD173 sur l'activité kinase de DYRK1A dans les extraits de cerveaux des rats Dup(Rno11)-APP^{H3} et Dup(Rno11-20)-APP^{H3} traitées pendant 12-13 jours.

L'activité kinase de DYRK1A est augmentée dans les groupes Dup(Rno11)-APP^{H3} et Dup(Rno11-20)-APP^{H3} NT par rapport aux groupes APP^{H2}. Cependant, une augmentation du dosage kinase de DYRK1A est toujours observée chez les rats modèles du SD traités avec l'EMD173. Les valeurs représentent des moyennes \pm erreur-type. Statistiques : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

VII. Conclusion générale des résultats de l'étude de nouveaux inhibiteurs de DYRK1A sur les modèles rongeurs du SD.

Les résultats de l'étude des Leucettinibs sur les modèles souris et rats du SD sont synthétisés dans la **Table 20**.

La **première étude** réalisée avec l'EMD10 chez les souris Tg(*Dyrk1a*) à une dose de 3 mg/kg pendant 19 jours de traitements permet une correction de la mémoire spatiale à long terme et de la mémoire de reconnaissance de ce modèle. Au niveau moléculaire, une diminution de l'activité catalytique de DYRK1A est observée chez les souris Tg(*Dyrk1a*) T par rapport aux souris Tg(*Dyrk1a*) NT. La phosphorylation de TAU sur les résidus de Ser202/Thr205

est réduite chez les souris Tg(*Dyrk1a*) traitées avec l'EMD10. L'analyse du kinome a mis en évidence une normalisation de l'activité kinase de DYRK1A dans les extraits protéiques de demi-cerveaux de souris Tg(*Dyrk1a*) T par rapport aux NT.

La **seconde étude** a permis démontrer que la réduction du nombre de jours de traitement à 10 avec l'EMD10 corrige quand même la mémoire spatiale à long terme et la mémoire de reconnaissance des souris Tg(*Dyrk1a*).

La **troisième étude**, toujours effectuée sur le modèle Tg(*Dyrk1a*), a permis de valider la deuxième Leucettinib, l'EMD92, à une dose dix fois plus faible que l'EMD10 pour l'amélioration de la mémoire de reconnaissance et de la mémoire spatiale des souris surexprimant le gène *Dyrk1a*. Par ailleurs, cette étude a aussi mis en lumière une correction de la mémoire de travail chez les souris Tg(*Dyrk1a*) traitées avec l'EMD92.

La **quatrième étude** a été réalisée sur un modèle plus complexe du SD, le modèle Dp1Yey. Le traitement de 11 jours avec l'EMD92 à une dose de 0.3 mg/kg restaure la mémoire de reconnaissance des souris Dp1Yey. L'efficacité du traitement sur la mémoire de travail et la mémoire spatiale à long terme ne peut être évalué du fait de l'absence de déficit chez les souris Dp1Yey NT. L'étude d'imagerie cérébrale réalisée au 11^{ème} jour de cette étude a mis en évidence des altérations morphologiques et des changements dans la substance blanche des cerveaux de souris Dp1Yey NT. De plus, l'inhibition de DYRK1A avec l'EMD92 chez les souris Dp1Yey conduit à des modifications de la connectivité fonctionnelle des structures liées à la mémoire. L'étude du dosage kinase de DYRK1A et de l'analyse de l'activité de l'ensemble du kinome révèlent une inhibition de l'activité catalytique de DYRK1A chez les souris Dp1Yey T par rapport aux NT.

La **cinquième étude** qui correspond à la dernière étude sur les modèle souris du SD a été effectuée sur le modèle Dp1Yey avec la dernière Leucettinib testée, l'EMD173. Le traitement de 11 jours avec l'EMD173 corrige les déficits de la mémoire de reconnaissance des souris Dp1Yey et cela aux deux doses de traitement utilisées : 0.3 mg/kg et 3 mg/kg. Le dosage de l'activité kinase de DYRK1A sur les extraits de cerveaux de souris Dp1Yey traitées ne montre aucune inhibition de l'activité catalytique de DYRK1A. L'analyse du profil du kinome met en évidence une augmentation globale de l'activité chez les souris Dp1Yey et une inhibition de l'activité de 33% des kinases de la famille AGC chez les Dp1Yey traités avec l'EMD92.

Enfin, la **sixième étude** a été réalisée sur les modèles rats du SD, Dup(Rno11)-APP^{H3} et Dup(Rno11-20)-APP^{H3}, à une dose de 0.5 mg/kg pendant 12-13 jours de traitement avec l'EMD173. Aucun effet de l'EMD173 n'est observée sur l'apprentissage et la mémoire spatiale à long terme des rats Dup(Rno11)-APP^{H3}. En revanche, l'EMD173 permet une amélioration de la mémoire spatiale à long terme des rats Dup(Rno11-20)-APP^{H3}. Concernant l'analyse moléculaire sur les extraits protéiques de demi-cerveaux de rats, aucun effet de l'EMD173 n'est observé sur l'activité kinase des rats Dup(Rno11)-APP^{H3} et Dup(Rno11-20)-APP^{H3} T. L'analyse du profil du kinome est en cours d'analyse et ne sera pas présenté dans ce manuscrit.

Étude	1	2	3	4	5	6	
Espèce	Souris					Rat	
Modèle	Tg(<i>Dyrk1a</i>)	Tg(<i>Dyrk1a</i>)	Tg(<i>Dyrk1a</i>)	Dp1Yey	Dp1Yey	Dup(Rno11)-APP ^{H3}	Dup(Rno11-20)-APP ^{H3}
Leucettinib	EMD10	EMD10	EMD92	EMD92	EMD173	EMD173	
Dose	3 mg/kg	3 mg/kg	0.3mg/kg	0.3 mg/kg	0.3 et 3 mg/kg	0.5 mg/kg	
Durée	19 jours	10 jours	10 jours	11 jours	11 jours	12-13 jours	
Mémoire de travail (labyrinthe en Y)	/	/	↗	∅	/	/	
Mémoire spatiale à court terme (OPP)	↗	↗	↗	∅	/	/	
Mémoire de reconnaissance (NOP)	↗	↗	↗	↗	↗	/	
Apprentissage et mémoire spatiale à long terme (Piscine de Morris)	/	/	/	/	/	≠	↗
Imagerie cérébrale (IRMf)	/	/	/	/	↗	/	
Activité kinase de DYRK1A	↗	/	/	↗	≠	≠	
Phosphorylation de Tau	↗	/	/	/	/	/	
Profil du kinome	↗	/	/	↗	↗	En cours d'analyse	

Table 20 : Synthèse des résultats de l'étude des nouveaux inhibiteurs de DYRK1A chez les modèles rongeurs du SD.

/ indique que le test ou l'analyse n'a pas été réalisé, ∅ représente l'absence de déficit des modèles du SD, ≠ indique l'absence d'effet du traitement et ↗ désigne une amélioration par rapport aux modèles du SD non traités

Projet III : Identification de potentiels nouveaux interacteurs de DYRK1A

L'**objectif** de ce troisième projet a été l'identification de potentiels nouveaux interacteurs de DYRK1A. Du fait de sa fonction de kinase, mais également des interactions protéine-protéine, DYRK1A est impliquée dans de nombreux processus biologiques. Afin d'identifier de potentiels nouveaux partenaires protéiques de DYRK1A, un système d'analyse d'interaction protéine-protéine a été optimisé : le modèle *Dyrk1a^{ost/ost}* possédant un TAG sur DYRK1A combiné à une chromatographie d'affinité sur colonne. Le TAG sur DYRK1A, dit Strep-tag II, se lie à la Strep-Tactin présent dans la résine de colonne et permet ainsi la capture de DYRK1A et de ses potentiels interacteurs protéiques qui sont ensuite élués dans les fractions d'élutions. J'ai optimisé et validé ce « *pull-down* » de DYRK1A en regardant, par analyse de western blot, la présence de DYRK1A dans les fractions d'élution des colonnes sur lesquelles des extraits protéiques de cerveaux provenant de souris *Dyrk1a^{ost/ost}* ou de souris contrôles wt ont été déposés, ainsi que son absence dans les fractions de lavage de celles-ci. Les fractions d'élutions pour lesquels la présence de DYRK1A a été validée ont été analysées par spectrométrie de masse afin d'identifier les protéines présentes dans celles-ci et de déterminer de potentiels nouveaux interacteurs de DYRK1A.

I. Optimisation de la technique du *pull-down*

Toutes les expériences ont été réalisées à partir d'extraits protéiques provenant de souris wt et *Dyrk1a^{ost/ost}* mâles âgés de 10 à 12 semaines. La première expérience a été effectuée à partir d'extrait protéiques provenant d'un demi-cerveau de souris pour chaque génotype, wt et *Dyrk1a^{ost/ost}*. Une fois le *pull-down* réalisé sur les colonnes de chromatographie d'affinité, les différentes fractions de lavages et d'élutions provenant de chaque colonne (wt et *Dyrk1a^{ost/ost}*) ont été déposées sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE. Les protéines présentes sur le gel ont été marquées avec une coloration d'argent, permettant ainsi de révéler la présence ou non de protéines dans les différentes fractions de lavages et d'élution.

La coloration à l'argent montre une diminution des protéines au fur et à mesure des lavages (**Figure 73A**). Les derniers lavages (fractions 4 et 5) ne contiennent plus aucunes protéines.

Toutes les protéines non fixées à la résine de la colonne ont donc été éluées et la colonne de chromatographie n'est donc pas saturée en protéine. Concernant les fractions d'éluitions, des bandes sont observées à la taille de la protéine de DYRK1A dans les fractions d'éluitions 2 et 3 (environ 85-90 kDa). Afin de savoir si ces bandes correspondent bien à DYRK1A, un western blot avec un anticorps dirigé contre DYRK1A a été réalisé sur les fractions de lavages et d'éluitions provenant des deux colonnes. Aucun marquage de DYRK1A n'est observé dans les fractions des deux colonnes (**Figure 73B**). De plus, seulement un très faible marquage est présent dans les deux premières fractions de lavages provenant de chaque colonne. La majorité de DYRK1A n'a donc probablement pas été bloquée dans la colonne.

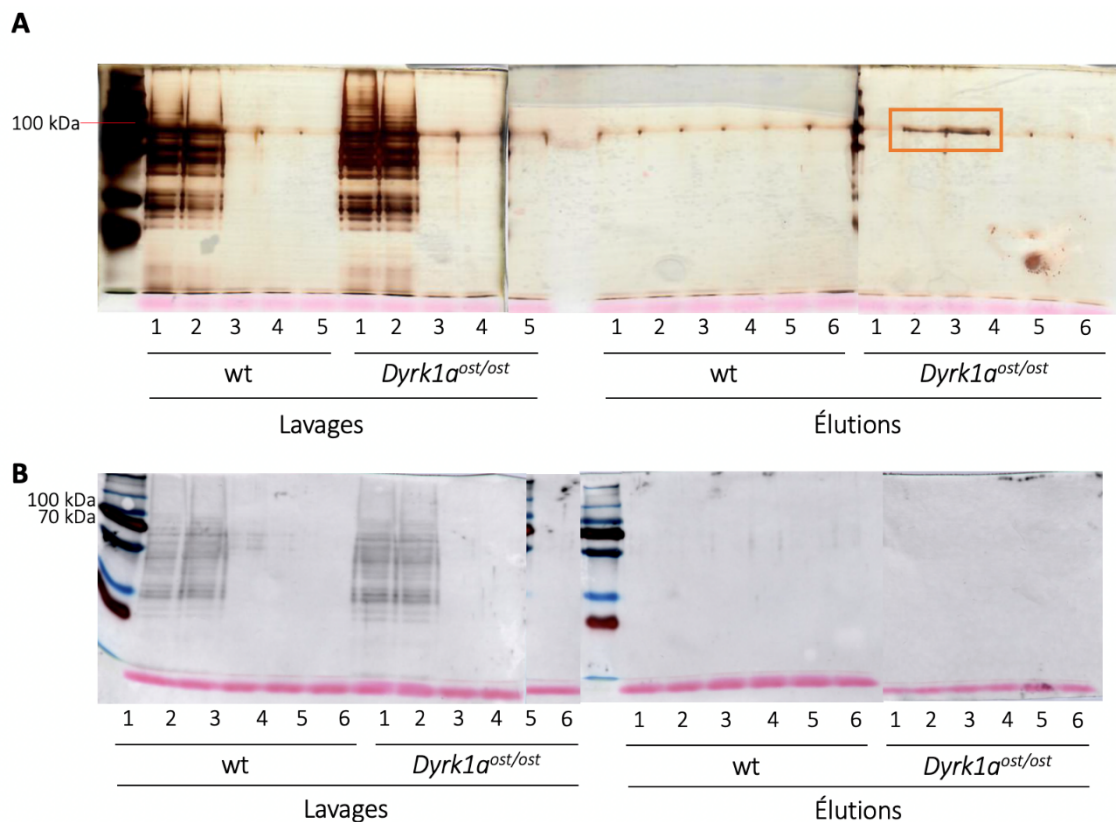


Figure 73 : Étude des fractions de lavages et d'éluitions du *pull-down* effectué à partir de demi-cerveau de souris wt et *Dyrk1a^{ost/ost}*.

(A) Coloration à l'argent des protéines du gel de polyacrylamide. Les protéines présentes dans les fractions d'éluitions de la colonne *Dyrk1a^{ost/ost}* sont encadrées en orange. **(B)** Western blot dirigé contre DYRK1A sur les fractions de lavages et d'éluitions provenant des colonnes wt et *Dyrk1a^{ost/ost}*.

Suite à ces premiers résultats, la quantité de protéine déposée sur chaque colonne a été doublée. Pour cela, la seconde expérience a été réalisée à partir d'extrait protéique provenant d'un cerveau entier de chaque génotype, wt et *Dyrk1a^{ost/ost}*. Concernant la coloration d'argent, une diminution de la quantité de protéines est observée au fur et à mesure des lavages (**Figure 74A**). Toutes les protéines non fixées aux colonnes ont été éluées et les colonnes ne sont donc pas saturées. Lors du dépôt des protéines dans les puits du gel pour la réalisation de la migration, nous avons décidé d'utiliser un marqueur de taille dont la quantité en protéines est connue pour chaque bande permettant ainsi d'évaluer la quantité de protéines potentiellement présentes dans les fractions d'élutions. Malheureusement, aucune coloration de protéines n'est observée dans les fractions d'élutions 2 et 3. L'absence de protéines dans les fractions d'élutions peut s'expliquer par une coloration argentée qui a été excessivement développée, entraînant une absence de coloration des protéines et un bruit de fond important. En effet, le gel de droite de la **Figure 74A** est jaunâtre par rapport aux autres gels ce qui indique un excès du développement de la coloration (Rabilloud et al. 1994). La séparation des protéines sur gel a été réalisée en parallèle pour la coloration à l'argent et pour les western blot. Par conséquent, le western blot avec un anticorps dirigé contre DYRK1A a tout de même été effectué sur les différentes fractions de lavages et d'élutions (**Figure 74B**). La présence de DYRK1A est observée dans les fractions de lavages des deux colonnes ainsi que dans la fraction d'élution 2 provenant de la colonne *Dyrk1a^{ost/ost}*. Puis un second western blot a été réalisé mais cette fois-ci sur certaines fractions dans le but d'identifier le pourcentage d'enrichissement de DYRK1A. Les fractions étudiées sont les suivantes : l'homogénat, le premier écoulement de la colonne, la première fraction de lavage et la seconde fraction d'élution (**Figure 74C**). Une réduction de la quantité de DYRK1A est observée dans la fraction de lavage de la colonne *Dyrk1a^{ost/ost}* par rapport à la colonne wt. Un marquage de DYRK1A est observé dans la deuxième fraction d'élution de la colonne *Dyrk1a^{ost/ost}* validant ainsi le fonctionnement de la colonne. Cependant, il faut tout de même noter que le rendement du *pull-down* est très faible. En effet, par rapport à la quantité de protéine de l'homogénat, nous avons perdu 98% des protéines de départ (premier écoulement et premier lavage) et seulement 2% sont capturés dans la colonne. Sachant que la quantité de protéine déposée sur la colonne (homogénat) est d'environ 10 µg/µL, la quantité de protéine récupérée dans les fractions d'élutions est estimée à 0.2 µg.

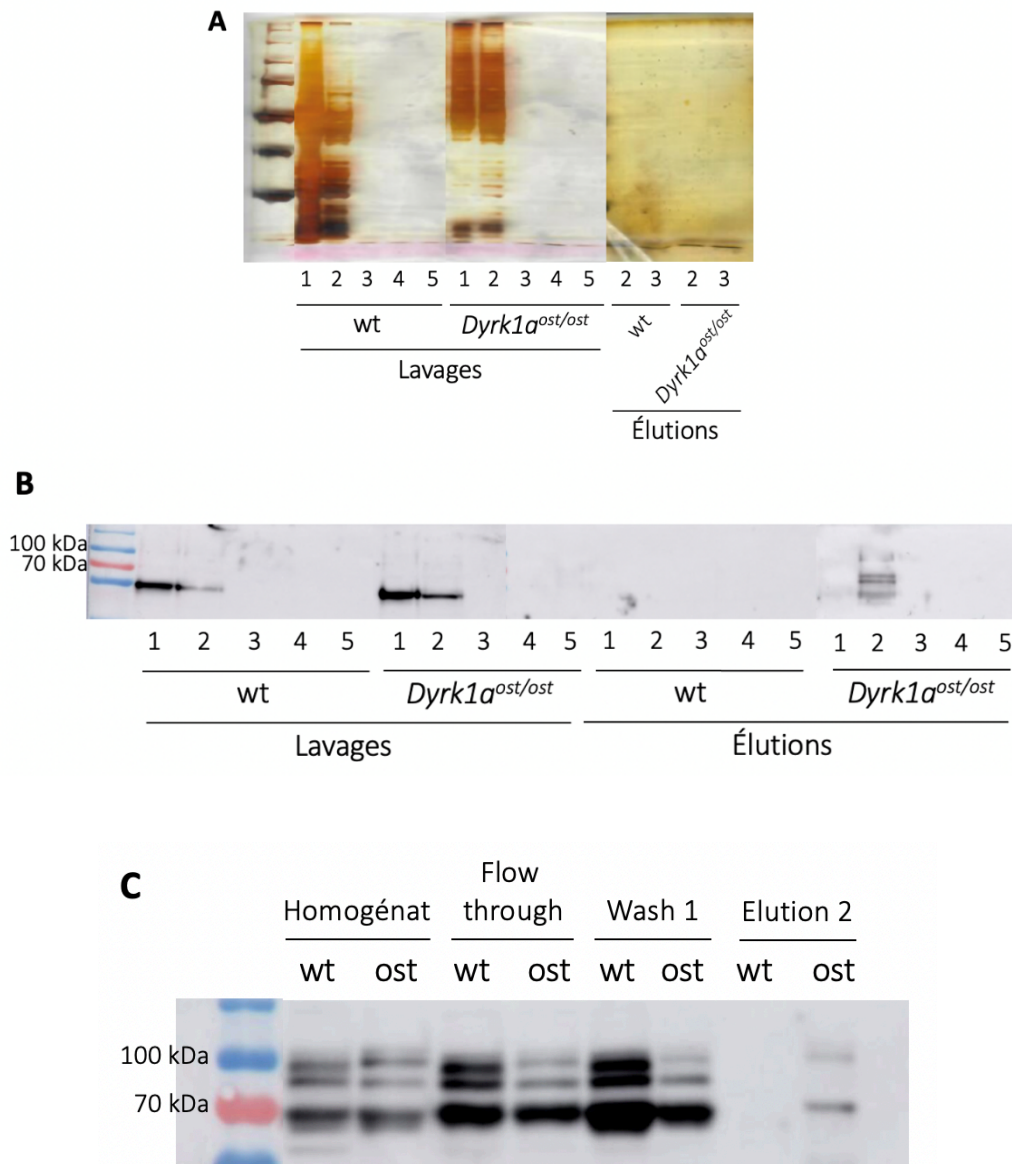


Figure 74 : Étude des fractions de lavages et d'éluions du *pull-down* effectué à partir d'un cerveau de souris wt et *Dyrk1a^{ost/ost}*.

(A) Coloration à l'argent des protéines du gel de polyacrylamide. Absence de coloration de protéines dans les fractions d'éluions de la colonne *Dyrk1a^{ost/ost}*. (B) Western blot dirigé contre DYRK1A sur les différentes fractions de lavages et d'éluions provenant des colonnes wt et *Dyrk1a^{ost/ost}*. (C) Western blot dirigé contre DYRK1A sur les homogénats déposés dans les colonnes wt et *Dyrk1a^{ost/ost}* (noté ost), le premier écoulement des colonnes (« flow through »), la première fraction de lavage (« wash ») et la seconde fraction d'éluion. Présence de DYRK1A dans la fraction d'éluion 2 de la colonne *Dyrk1a^{ost/ost}*.

Les conditions du *pull-down* ayant été validées, l'expérience a été réalisée une seconde fois avec des extraits protéiques provenant d'un cerveau entier de souris wt et *Dyrk1a^{ost/ost}* dans le but d'avoir deux réplicats biologiques pour l'analyse de spectrométrie de masse dont les résultats sont présentés à partir de la partie « II. Identification de potentiels nouveaux interacteurs de DYRK1A », page 253. Le deuxième *pull-down* réalisé avec un cerveau entier par génotype est encore une fois validé avec la présence de DYRK1A dans la fraction d'éluion 2 provenant de la colonne *Dyrk1a^{ost/ost}* (**Figure 75**).

D'après le fournisseur de la colonne, la protéine que l'on souhaite enrichir doit être majoritairement présente dans les fractions d'éluions 2 et 3. De plus, un marquage correspondant à la taille de DYRK1A dans la fraction d'éluion 3 a été observé dans le pull-down réalisé à partir d'un demi-cerveau de souris (**Figure 73A**). Par conséquent, les fractions 2 et 3 provenant de l'expérience réalisée avec les extraits protéiques d'un cerveau entier ont été sélectionnées pour l'analyse par spectrométrie de masse.

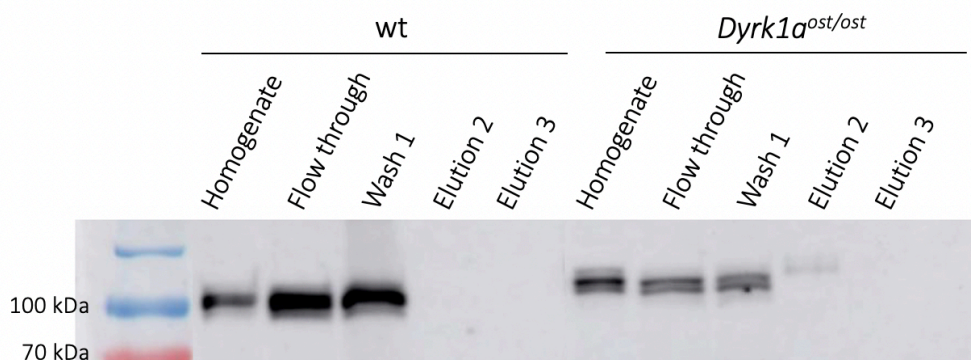


Figure 75 : Étude des fractions de lavages et d'éluions du second *pull-down* effectué à partir d'un cerveau de souris wt et *Dyrk1a^{ost/ost}*.

Le western blot réalisé avec un anticorps dirigé contre DYRK1A met en évidence la présence de cette protéine dans la fraction d'éluion 2 provenant de la colonne *Dyrk1a^{ost/ost}*.

II. Identification de potentiels nouveaux interacteurs de DYRK1A

Les fractions d'élutions provenant des deux *pull-down* réalisés à partir d'un cerveau wt et d'un cerveau *Dyrk1a^{ost/ost}* ont été confiées à la plateforme de protéomique de l'IGBMC pour une analyse de spectrométrie de masse. Cette analyse a pour but de valider la présence de DYRK1A dans les fractions d'élutions 2 et 3 des *pull-down* et d'identifier les autres protéines présentes. L'analyse par spectrométrie de masse a été réalisée en triplicata pour chaque échantillon avec deux réplicats biologiques pour chaque génotype, wt et *Dyrk1a^{ost/ost}*.

La quantification relative est basée sur le XIC (en anglais « *extracted-ion chromatogram* »), c'est-à-dire sur l'aire sous la courbe correspondant à la quantité de peptide. Ainsi chaque protéine a une valeur d'abondance (quantité) dans chaque échantillon. L'analyse en composantes principales (APC) (en anglais « *principal component analysis* ») est une méthode d'analyse statistique permettant d'étudier la structuration des variables, notamment celles qui sont corrélées et celles qui ne le sont pas. Dans notre étude, l'APC permet d'étudier les relations entre les spectres de masse. Ainsi, elle met en évidence que les deux réplicas biologiques et les trois triplicatas techniques de chaque échantillon biologique sont similaires et que les deux conditions (wt et *Dyrk1a^{ost/ost}*) sont bien séparées (**Figure 76A**). Par conséquent, les résultats des deux réplicas biologiques ont été regroupés pour chaque condition. Les résultats des fractions wt et *Dyrk1a^{ost/ost}* ont ensuite été comparés à l'aide d'un diagramme en volcan. Puis, le rapport des deux groupes a été réalisé à partir du logarithme binaire des valeurs XIC, ci-après noté *Dyrk1a^{ost/ost}* sur wt. La protéine DYRK1A a été identifiée uniquement dans les échantillons *Dyrk1a^{ost/ost}* et correspond à la protéine avec le ratio *Dyrk1a^{ost/ost}* sur wt le plus élevé. Les autres protéines ont été classées par le même rapport que DYRK1A, c'est-à-dire le ratio des deux groupes. Les vingt protéines ayant le ratio le plus fort (dont DYRK1A) sont notées en rouge sur la **Figure 76B**.

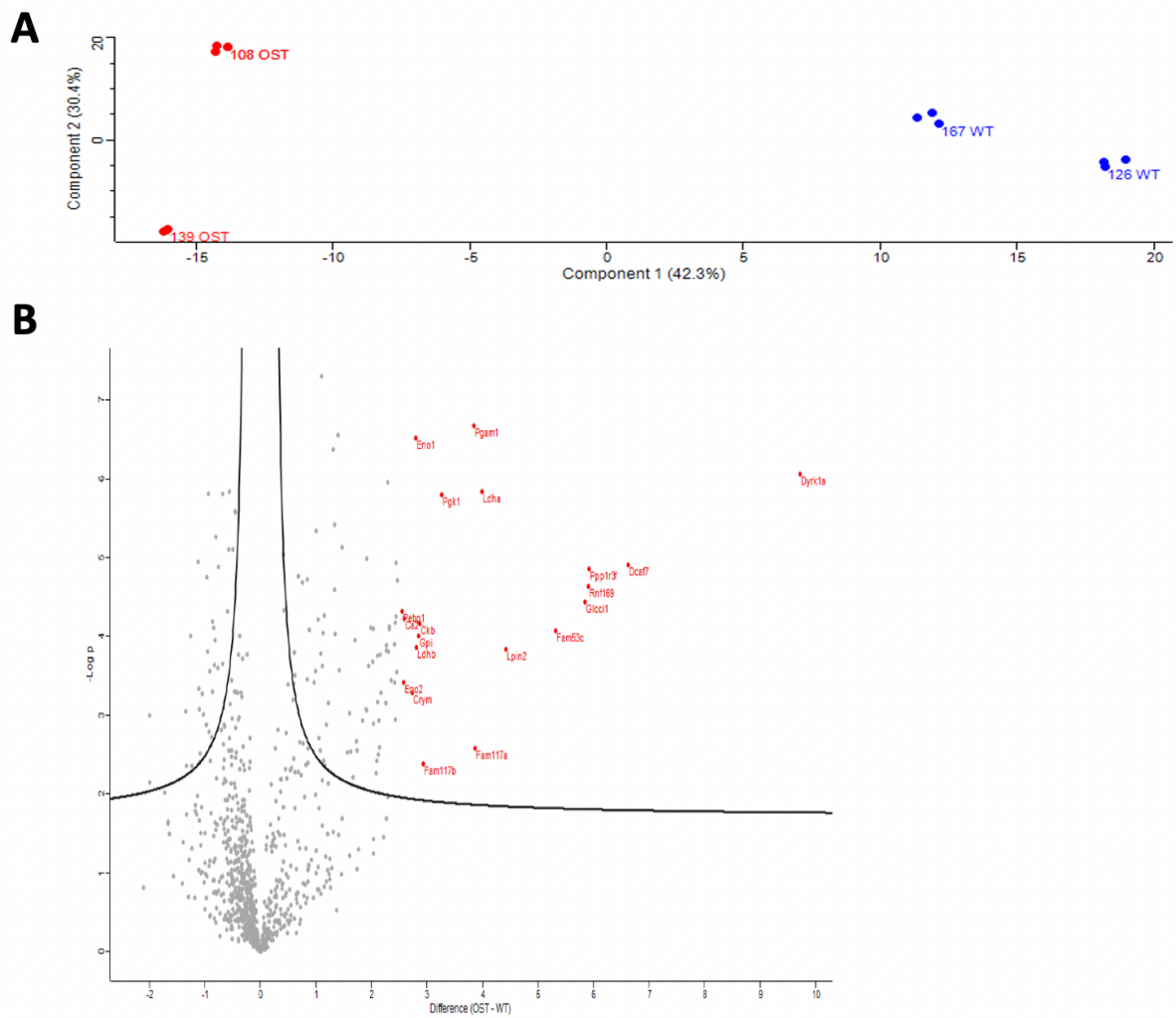


Figure 76 : Validation du *pull-down* de DYRK1A par spectrométrie de masse.

(A) Analyse PCA de la quantification relative (XIC, aire sous la courbe). (B) Représentation du rapport des fractions *Dyrk1a^{ost/ost}* sur ceux des fractions wt. Les protéines ayant le ratio *Dyrk1a^{ost/ost}* sur wt le plus fort sont représentées en rouge, dont DYRK1A.

Afin de valider l'efficacité du pull-down, j'ai recherché la présence d'interacteurs déjà connus de DYRK1A et toutes les protéines identifiées dans les fractions d'élutions ont ensuite été comparées à une base de données d'interaction protéine-protéine : « *Biological general repository for interaction datasets* » (BioGRID). L'analyse révèle que 14 protéines déjà connues comme étant des interacteurs de DYRK1A sont présentes dans les fractions d'élutions telles que la protéine WDR68 (« *WD repeat-containing protein 68* »). Les interacteurs connus de DYRK1A ayant les ratios *Dyrk1a^{ost/ost}* vs wt les plus élevés sont représentés dans la **Figure 77** et la **Table 21**.

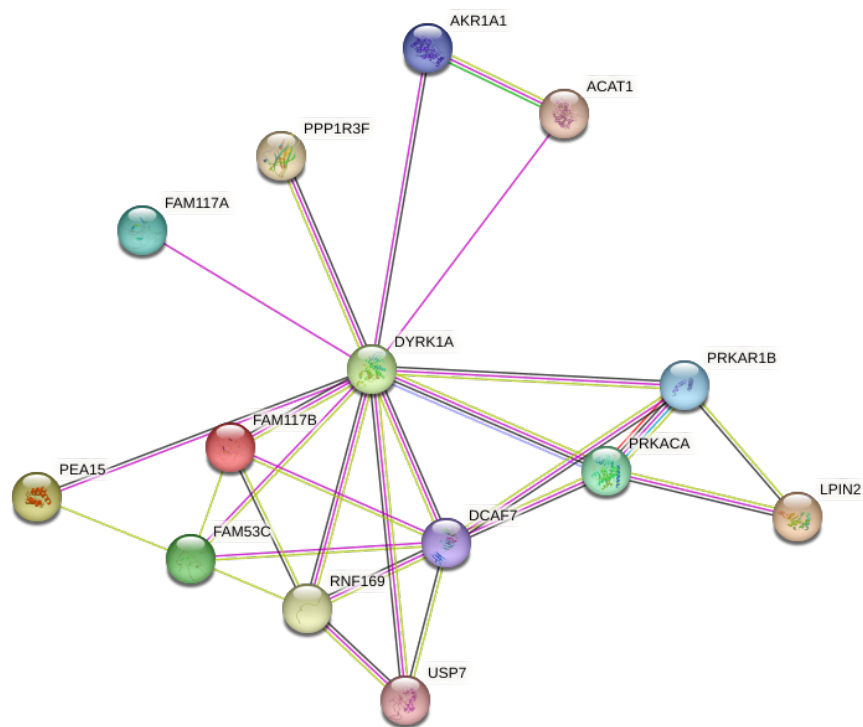


Figure 77 : Interaction entre DYRK1A ainsi que ses partenaires protéiques connus et identifiés dans les fractions d'élutions de la colonne *Dyrk1a^{ost/ost}*.

Image issue de la base de données « *Search tool for the retrieval of interacting genes/proteins* ».

Protéine symbole	Ratio ost vs wt
DYRK1A	841.99
WDR68	98.10
PPP1R3F	60.43
RNF169	59.88
GLCC1	57.79
FAM53C	39.77
LPIN2	21.40
FAM117A	14.61
FAM117B	7.67
PRKAR1B	4.90
ACAT1	4.31
AKR1A1	3.26
USP7	4.11
PEA15	3.27
PRKACA	3.05

Table 21 : Ratio *Dyrk1a^{ost/ost}* sur wt des partenaires protéiques connus de DYRK1A identifiés dans les fractions d'élutions de la colonne *Dyrk1a^{ost/ost}*.

Par ailleurs, nous avons identifié 59 protéines non connues comme interacteurs de DYRK1A dans les fractions d'élutions de la colonne *Dyrk1a^{ost/ost}*. Ces protéines listées dans la **Table 22** sont donc de potentiels interacteurs protéiques de DYRK1A et seront discutées dans la partie discussion.

Protéine	Ratio ost vs wt
LDHA	15.89
PGAM1	14.36
PGK1	9.60
CKB	7.35
GPI	7.21
LDHB	7.03
ENO1	6.97
CRYM	6.69
CA2	6.05
ENO2	5.98
PEBP1	5.86
HBB-B1	5.54
TALDO1	5.49
CMPK1	5.45
PKM	5.44
SOD1	5.38
QDPR	5.37
SCRN1	5.36
SOD2	5.34
ALB	5.10
MDH1	4.99
UCHL1	4.98
TKT	4.94
ACOT7	4.93
GDI2	4.82
GDI1	4.82
SF3B3	4.81
ANXA5	4.80
CTDP1	4.66
GOT1	4.52

Protéine	Ratio ost vs wt
FSCN1	4.46
MDH2	4.43
GOT2	4.40
SERPINA1A	4.36
NPEPPS	4.32
GSTM1	4.24
ACO2	4.11
ACACA	4.10
ARHGDI1A	4.09
TPI1	4.06
HBA	3.96
PPIA	3.86
AKR1B1	3.77
CS	3.76
PVALB	3.74
GAPDH	3.59
PARK7	3.41
DDAH1	3.35
PFN1	3.35
CALB1	3.32
GSTP1	3.18
PYGB	3.11
ACYP2	3.06
PRDX5	2.96
NUDT21	2.78
IMPA1	2.77
S100B	2.75
ALDOC	2.67
CALR	2.66

Table 22 : Potentiels partenaires protéiques de DYRK1A présents dans les fractions d'éluions de la colonne *Dyrk1a^{ost/ost}*.

Interactions entre les 59 potentiels partenaires de DYRK1A identifiés dans les fractions d'élutions du « *pull-down* ». Parmi les 59 protéines, 12 sont des protéines localisées dans les projections neuronales (en rouge), 10 sont exprimées dans les axones (en vert) et 9 dans les corps cellulaires neuronaux (en bleu). Cinq protéines sont localisées dans les trois compartiments neuronaux. *Issue de la base de données de « Search tool for the retrieval of interacting genes/proteins ».*

Pour conclure, ce projet a permis de valider une technique de *pull-down* de DYRK1A qui malgré un rendement faible, la quantité obtenue est suffisante pour aller à l'étape suivante d'analyse par spectrométrie de masse. Cette analyse a permis d'identifier des interacteurs protéiques connus de DYRK1A ainsi que d'identifier de potentiels nouveaux interacteurs de DYRK1A.

Discussion

Projet I : Nouveaux modèles rats présentant une haploinsuffisance et une trisomie du gène *Dyrk1a* pour l'étude des syndromes de MRD7 et de Down.

La trisomie du gène *Dyrk1a* chez le rat nécessite une région non-codante plus importante que chez la souris

Afin de générer des modèles de rats avec une seule copie ou trois copies du gène *Dyrk1a*, le système d'édition de gène CrispR-Cas9 a été utilisé pour engendrer la délétion ou la duplication d'un fragment de 121.7 kb localisé en Rno11:34,842,454-34,963,976 (rat génome RGSC 6.0/rn6) et contenant la séquence complète du gène *Dyrk1a*. Ce fragment correspond à la séquence présente dans le BAC ayant été intégré dans le génome du modèle Tg(*Dyrk1a*) (Guedj et al. 2012). Le modèle Dup2(*Dyrk1a*) présente une duplication d'un fragment d'une longueur de 219 kb localisée en Rno11:34,791,993-35,011,015 et contenant également la séquence complète du gène *Dyrk1a*. Alors que la présence d'une copie du gène dans le modèle Del(*Dyrk1a*) et de trois copies du gène dans les modèles Dup1(*Dyrk1a*) et Dup2(*Dyrk1a*) a bien été validée chez les individus utilisés pour générer la descendance de ces trois lignées, nous n'avons pas trouvé de surexpression de *Dyrk1a* dans le cerveau des rats de la lignée Dup1(*Dyrk1a*). La duplication de la même région utilisée pour les souris Tg(*Dyrk1a*) ne permet pas d'induire une augmentation de la quantité d'expression de protéine de DYRK1A dans le rat modèle Dup1(*Dyrk1a*) (Guedj et al., 2012). Cependant, l'élargissement de la région dupliquée chez le modèle Dup2(*Dyrk1a*) permet quant à lui une augmentation d'expression protéique de DYRK1A dans l'hippocampe des rats adultes du modèle Dup2(*Dyrk1a*). Ainsi, pour induire une augmentation de l'expression de DYRK1A, une plus grande région non-codante est nécessaire chez le modèle rat. De ce fait, les régions non-codantes dupliquées dans le modèle Dup2(*Dyrk1a*) doivent probablement contenir des séquences régulatrices nécessaires à la transcription de *Dyrk1a*. Ces séquences régulatrices doivent donc être dupliquées avec la séquence du gène d'intérêt. Ces résultats sous-tendent une différence du génome entre les espèces souris et rat car la séquence de 121.7 kb est suffisante pour induire une augmentation

de l'expression protéique de DYRK1A chez les souris Tg(*Dyrk1a*) (Guedj et al., 2012) alors que sa duplication n'entraîne pas de surexpression chez les rats Dup1(*Dyrk1a*). Du fait de l'augmentation de taille de la région dupliquée, nous avons vérifié que l'expression des gènes *Dscr3* et *Kcnj6* ne sont pas impactés. Aucune perturbation de l'expression d'ARN de *Dscr3* et *Kcnj6* n'ayant été observée dans le modèle Dup2(*Dyrk1a*), les phénotypes observés et discutés sont l'unique conséquence de la trisomie de *Dyrk1a*.

Modèle Del(*Dyrk1a*) : modèle rat de l'haploinsuffisance de *Dyrk1a* reflète les phénotypes observés chez les modèles souris *Dyrk1a*^{+/-}

Fonctions non-mnésiques

Une diminution de l'activité spontanée des rats a été observée dans le test de l'activité circadienne au cours de la session d'habituation et de la session nocturne, reflétant une altération de leur activité intrinsèque au cours de leur phase d'activité. De plus, une réduction de l'activité locomotrice des rats Del(*Dyrk1a*) est également observée par la diminution du nombre de redressements au cours de ce même test mais aussi par une diminution de la distance totale parcourue dans l'arène pendant le test du champ ouvert. Par ailleurs, l'hypoactivité dans ce test est aussi associée à la phase d'habituation, montrant un impact sur le comportement d'exploration d'un nouvel environnement. Il semblerait que les rats Del(*Dyrk1a*) présentent une altération lorsqu'ils sont exposés à des environnements nouveaux non stressants. Le phénotype d'hypoactivité a également été rapporté chez les souris *Dyrk1a*^{+/-} avec une diminution du nombre de redressement ainsi que de la distance parcourue dans le test du champ ouvert (V. Fotaki et al. 2004; Raveau et al. 2018). Au cours de notre étude, le comportement anxieux des rats Del(*Dyrk1a*) n'est pas impacté dans le test du champ ouvert et du labyrinthe en Y. Ces résultats sont similaires à ceux observés chez les modèles souris *Dyrk1a*^{+/-} qui ne présentent également pas de modification de leur anxiété par rapport aux animaux contrôles (Raveau et al. 2018).

Fonctions mnésiques

Les déficits des capacités d'apprentissage et de mémoire des rats Del(*Dyrk1a*) reproduisent au moins en partie ceux des souris présentant aussi une délétion du gène *Dyrk1a*.

Par exemple, une absence de déficit de la mémoire de travail est soulignée par le test du labyrinthe en Y chez les rats *Del(Dyrk1a)* comme cela a été démontré chez les souris *Dyrk1a^{+/-}* (Brault et al. 2021). Les rats *Del(Dyrk1a)* ne présentent pas de déficit de la mémoire spatiale à long terme, mais l'apprentissage de la localisation de la plateforme et donc de l'apprentissage spatiale est altérée dans la tâche de la piscine de Morris, comme chez les souris *Dyrk1a^{+/-}* (Arqué et al. 2008). La mémoire spatiale à court terme qui est fortement dépendante de l'hippocampe a été mesurée avec le test de l'OPP. Cette mémoire est clairement altérée chez les rats *Del(Dyrk1a)*. Ce type de mémoire n'a jamais été étudiée chez les souris *Dyrk1a^{+/-}*. Alors qu'une altération de la mémoire de reconnaissance a été montrée chez les souris *Dyrk1a^{+/-}* avec le NOP à deux objets, aucun déficit dans les NOP à deux ou trois objets n'est mis en évidence chez les rats *Del(Dyrk1a)* (Arqué et al. 2008). Cette différence peut s'expliquer par le fait que les tests du NOP à deux et trois objets est trop simple pour révéler un déficit de reconnaissance d'objet chez le rat. Une autre hypothèse est que l'haploinsuffisance de *Dyrk1a* chez le rat ne conduit simplement pas à une altération de la mémoire de reconnaissance. Le MRD7 est un syndrome du trouble du spectre de l'autisme et le modèle *Del(Dyrk1a)* représente bien ses caractéristiques avec une diminution des interactions sociales comme soulignée chez les souris *Dyrk1a^{+/-}* dont le domaine catalytique a été tronqué (Raveau et al. 2018).

Impact de l'haploinsuffisance de *Dyrk1a* sur le transcriptome du rat adulte

L'analyse transcriptomique des rats adultes *Del(Dyrk1a)* a mis en évidence une altération de la régulation des voies de signalisation synaptiques, dont celles impliquées dans les processus d'apprentissage, de mémorisation, de la synapse ainsi que de la morphogenèse des axones et des dendrites. Ces résultats concordent avec l'analyse comportementale mettant justement en évidence des déficits de mémoire comme dans le test de l'OPP. Les résultats obtenus chez les rats *Del(Dyrk1a)* devront par la suite être comparés aux rats *Dup2(Dyrk1a)*. Nous pouvons tout de même noter que les analyses de transcriptomiques réalisées par le Dr. Muniz-Moreno sur les souris *Dyrk1a^{+/-}* mettent également en évidence une dérégulation de 93% de voies de signalisations synaptiques (manuscrit de thèse du Dr. Muniz-Moreno). Ces voies sont impliquées au niveau des membranes pré et post-synaptiques ainsi que des axones. Les voies synaptiques touchées sont plus particulièrement les GABAergiques, sérotoninergiques, glutamatergiques ainsi que cholinergiques. Ces résultats sont similaires à ceux des rats *Del(Dyrk1a)* et par conséquent, il paraît important d'identifier des gènes clés

impliquées dans les signalisations synaptiques qui sont dérégulées chez les deux modèles rat et de valider leur expression par une autre technique, notamment par une RT-qPCR.

Conclusion sur le modèle rat Del(*Dyrk1a*) et perspectives

Les patients atteints du MRD7 présentent un retard de croissance, une microcéphalie, une dysmorphie faciale, une démarche ataxique, un trouble de l'alimentation, une absence d'élocution, un trouble du spectre de l'autisme et une déficience intellectuelle (Møller et al. 2008; Courraud et al. 2021). Notre modèle rat Del(*Dyrk1a*) reproduit bien des anomalies des fonctions cognitives avec une altération de leur mémoire spatiale à court terme ainsi que de l'apprentissage spatiale. Les souris *Dyrk1a*^{+/-} présentent une hypoactivité et une altération de la force de préhension et des déplacements avec un temps de foulé plus court que les souris contrôles (V. Fotaki et al. 2004). Notre étude montre que les rats Del(*Dyrk1a*) présentent eux aussi une hypoactivité. Toutefois, il serait intéressant de mieux caractériser les fonctions motrices des rats Del(*Dyrk1a*) en évaluant la coordination motrice et l'équilibre des animaux avec des tests tels que le test de barre ou encore le test du « *Paw-print* » ((Carter, Morton, et Dunnett 2001) Les résultats permettront de vérifier si l'haploinsuffisance de *Dyrk1a* chez le rat permet de mieux reproduire l'ataxie observée chez les patients atteints du syndrome de MRD7. Par ailleurs, de nombreuses études mettent en évidence que le gène *Dyrk1a* est impliqué dans la régulation de la balance excitation/inhibition entre le système neuronal glutamatergique et GABAergique (Souchet et al. 2014; 2015). Une dérégulation de la balance peut conduire à des épilepsies qui sont justement observées chez les personnes atteintes du syndrome de MRD7 (Møller et al. 2008; Courcet et al. 2012). Par conséquent, un test de susceptibilité à l'épilepsie devrait être effectué par injection de l'agent pro-convulsivant, le pentylènetétrazole. Ainsi, cela permettrait de vérifier si comme pour les phénotypes mnésiques, les rats Del(*Dyrk1a*) présentent une susceptibilité à l'épilepsie tel que dans le syndrome de MRD7. De plus, une étude crânio-faciale chez les rat Del(*Dyrk1a*) mâles et femelles est en cours d'analyse par le Dr. Ahumada Saavdra, afin de confirmer une microcéphalie comme rapporté dans le MRD7 (Ji et al. 2015; Courraud et al. 2021). Les résultats seront ensuite intégrés à la publication. Aux vues de ces premiers résultats nous pouvons conclure que nous avons réussi à valider un nouveau modèle d'étude du syndrome de MRD7 chez le rat.

Le modèle de trisomie de *Dyrk1a* reflète les phénotypes observés chez les modèles souris du SD surexprimant *Dyrk1a*.

Fonctions non-mnésiques

Chez les rats Dup2(*Dyrk1a*), une hypoactivité au cours du test de l'activité circadienne a été mis en évidence uniquement lors des sessions nocturnes. De plus, aucun effet sur le nombre de redressement n'a été observé. Cependant, cette hypoactivité des rats Dup2(*Dyrk1a*) semble bien moins prononcée que celle observée chez les rats Del(*Dyrk1a*). Par ailleurs, un effet miroir de l'activité locomotrice des rats Dup2(*Dyrk1a*) par rapport aux rats Del(*Dyrk1a*) a été mise en évidence dans le test du champ ouvert. En effet, les rats trisomiques pour le gène *Dyrk1a* ont une hyperactivité au commencement de la phase d'exploration d'un nouvel environnement, alors que les rats Del(*Dyrk1a*) présentent au même moment une hypoactivité. Ces résultats reflètent un effet dose-dépendant du gène *Dyrk1a* sur l'activité locomotrice spontanée des rats. Ce contraste est aussi observé chez les modèles souris. En effet, les souris Tg(*Dyrk1a*) présentent une hyperactivité alors que les souris *Dyrk1a*^{-/-} sont hypoactives (Duchon et al. 2021; V. Fotaki et al. 2004). Au cours du test du champ ouvert, aucune différence sur la distance parcourue au centre ou en périphérie n'est soulignée chez les rats Dup2(*Dyrk1a*) par rapport aux contrôles. Par conséquent, les rats Dup2(*Dyrk1a*) ne présentent pas d'altération de leur comportement anxieux par rapport aux contrôles et la surexpression de *Dyrk1a* ne conduit pas à l'altération de ce comportement chez le rat.

Fonctions mnésiques

Concernant l'étude des capacités de mémoire et d'apprentissage des rats Dup2(*Dyrk1a*), nous avons tout d'abord observé une absence d'altération de la mémoire de travail dans le test du labyrinthe en Y. Ces résultats ont été surprenants car le modèle souris Tg(*Dyrk1a*) présente une diminution du nombre de pourcentage d'alternances spontanées effectuées et ainsi une altération de la mémoire de travail à court terme (Duchon et al. 2021). Il serait intéressant d'évaluer la mémoire à court terme avec un test plus complexe que celui du labyrinthe en Y, notamment avec le test du labyrinthe à bras qui permet de mesurer la mémoire de travail ainsi que la mémoire de référence (Olton, Collison, et Werz 1977). Même

si des similitudes de surexpression de *Dyrk1a* existent entre les modèles souris et rat, il faut néanmoins souligner les différences.

Par ailleurs, la tâche de la piscine de Morris ne révèle pas d'altération de la performance des rats Dup2(*Dyrk1a*) au cours des deux phases du test (phase d'acquisition et de rappel). Le modèle Dup2(*Dyrk1a*) ne présente donc pas d'altération de leurs capacités d'apprentissage et de mémoire spatiale à long terme contrairement aux souris Tg(*Dyrk1a*) qui sont moins performantes que les contrôles (Guedj et al. 2014). Cela peut s'expliquer par le fait que les rats sont généralement plus compétents et moins stressés par le test de la piscine de Morris, par conséquent il est possible qu'un déficit cognitif ne soit pas visible dans ce test (Ellenbroek et Youn, 2016). Un autre test tel que le labyrinthe de Barnes pourrait être utilisé pour valider l'absence d'altération de l'apprentissage et de la mémoire spatiale chez les rats Dup2(*Dyrk1a*). De plus, nous avons montré que les rats Dup2(*Dyrk1a*) ont une altération de la mémoire spatiale dans le test de l'OPP avec 5 minutes de rétention. Chez les souris Tg(*Dyrk1a*), un déficit dans le test de l'OPP avec 24 heures de rétention a été rapporté (Nguyen et al. 2018). Ces altérations cognitives ne sont pas comparables entre les modèles souris et rats, car chez les souris trisomiques pour le gène *Dyrk1a*, un déficit de la mémoire spatiale à long terme est observé alors que chez le rat, nous avons un déficit de la mémoire à court terme. Une altération de la mémoire de reconnaissance d'objet à long terme évaluée avec le NOP à trois objets a été démontrée chez les rats Dup2(*Dyrk1a*). Ces résultats ne sont pas équivalents au déficit de la mémoire de reconnaissance à long terme observé chez les souris transgéniques Tg(*Dyrk1a*), car le test du NOP utilisé est celui à deux objets (Nguyen et al. 2018 ; Duchon et al. 2021). Malheureusement, le test du NOP à deux objets n'a été pas effectué sur le modèle rat Dup2(*Dyrk1a*), il conviendrait donc de le réaliser afin de pouvoir comparer les résultats avec ceux des souris Tg(*Dyrk1a*).

Conclusion sur le modèle Dup2(*Dyrk1a*) et perspectives

Nous avons validé un nouveau modèle trisomique pour le gène *Dyrk1a* chez le rat, présentant une altération des fonctions cognitives : la mémoire de localisation de l'objet ainsi que la mémoire de reconnaissance d'objet. Dans de futures études, ce modèle pourra être utilisé afin de mieux analyser l'impact de la surexpression de DYRK1A chez le rat et de

comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents aux phénotypes observés dans le SD. L'étude de transcriptomique nous permettra d'identifier des voies de signalisations dérégulées dans notre modèle pour comprendre les perturbations moléculaires conduisant à l'apparition des déficits mnésiques. Cependant, la caractérisation du modèle n'est pas terminée.

Il a été montré que la surexpression de DYRK1A est impliquée dans l'apparition des dysmorphies faciales comme observées dans le SD (Redhead et al. 2022). Une analyse crâniofaciale des rats Dup2(*Dyrk1a*) mâles et femelles en cours d'analyse. Une fois finalisée, les résultats seront intégrés à la publication.

Par ailleurs, de nombreuses études ont démontré que l'inhibition de l'activité kinase de DYRK1A – chez des modèles trisomiques pour le gène *Dyrk1a* – permet de corriger les fonctions mnésiques de ces animaux (Stensen et al. 2021; Atas-Ozcan et al. 2021). Ce modèle rat Dup2(*Dyrk1a*) pourra donc être utilisé pour confirmer la reproductibilité de l'efficacité de traitements médicamenteux sur la correction des fonctions mnésiques via l'inhibition de l'activité de DYRK1A sur un autre modèle que la souris. Afin de réaliser une telle étude, il nous faut d'abord valider la suractivité de la kinase DYRK1A chez les rats Dup2(*Dyrk1a*).

Projet II : Étude de nouveaux inhibiteurs de la kinase DYRK1A sur des modèles de rongeurs du syndrome de Down

Validation de l'efficacité des leucettinibs EMD10 et EMD92
sur la correction des capacités cognitives
des modèles souris Tg(*Dyrk1a*) et Dp1Yey

L'EMD10 corrige les fonctions mnésiques des souris Tg(*Dyrk1a*)

La L41 est inhibiteur compétitif de DYRK1A – synthétisé par l'équipe de Perha Pharmaceuticals – permettant de corriger certains déficits cognitifs des modèles souris du SD après 19 jours de traitement par la normalisation de l'activité de DYRK1A (Nguyen et al., 2018). L'EMD10 est l'une des Leucettinibs dérivée de la L41 qui a l'avantage de traverser la barrière intestinale en plus de la barrière hématoencéphalique permettant ainsi une administration orale contrairement à la L41 qui a été administrée par injection intrapéritonéale aux animaux. De plus, l'EMD10 présente une meilleure spécificité à DYRK1A avec un IC50 de 20.3 nM, contre 24.6 nM pour la L41. En premier lieu, nous avons souhaité valider l'efficacité de l'EMD10 dans des conditions similaires à celle de la L41. La première étude a donc été réalisée sur le modèle souris trisomique pour le gène *Dyrk1a* pendant 19 jours de traitements, mais à une dose plus faible que celle utilisée pour la L41, c'est-à-dire à 3 mg/kg/jour, alors que la L41 a été administrée à 20 mg/kg/jour. L'impact du traitement sur les fonctions mnésiques des souris Tg(*Dyrk1a*) a été évalué comme pour l'étude du Dr. Nguyen avec le test de l'OPP pour la mémoire de localisation d'objet et le test du NOP pour la mémoire de reconnaissance d'objet. Le traitement des souris Tg(*Dyrk1a*) avec l'EMD10 permet d'obtenir des résultats semblables à ceux d'études antérieures réalisées avec la L41 (Nguyen et al., 2018). En effet, le traitement avec l'EMD10 des souris Tg(*Dyrk1a*) pendant 19 jours, a permis une correction de la mémoire de reconnaissance à long terme comme observée avec un traitement de 19 jours avec la L41. Le dosage de l'activité catalytique de DYRK1A sur les extraits de cerveaux de souris provenant

des différents groupes souligne une normalisation de l'activité kinase de DYRK1A chez les souris Tg(*Dyrk1a*) traitées avec l'EMD10 pendant 19 jours.

De prime abord, les deux molécules semblent donc similaires. Cependant, il faut souligner que le traitement avec la L41 a été réalisé à une dose de 20 mg/kg/jour contre 3 mg/kg/jour pour l'EMD10. La L41 avait été testée chez les souris Tg(*Dyrk1a*) à une dose de 10 mg/kg qui a permis une diminution de l'activité de DYRK1A, mais l'impact de cette dose n'a pas été vérifiée sur les fonctions mnésiques des souris. D'autre part, la L41 ne corrige pas le déficit de mémoire spatiale à long terme des souris Tg(*Dyrk1a*) mesurée avec le test de l'OPP, alors que le traitement à l'EMD10 permet la correction de ce déficit chez les souris Tg(*Dyrk1a*), reflétant une meilleure efficacité de l'EMD10 par rapport à la L41 (Nguyen et al., 2018). La mémoire de localisation d'objet s'appuie fortement sur l'hippocampe tandis que la mémoire de reconnaissance d'objet est dépendante de plusieurs régions corticales – tels que le cortex insulaire, cortex périrhinal et le cortex préfrontal – en plus de l'hippocampe (Haettig et al. 2011; Mumby et al. 2002; Akirav et Maroun 2005; Winters 2005). Pour la mémoire de reconnaissance d'objet, l'hippocampe est nécessaire pour coder les informations contextuelles de l'objet qui correspond donc à la phase de présentation du test du NOP, alors qu'une altération de l'hippocampe dorsal avant la récupération de la mémoire (phase de test du NOP) induit par une injection de muscimol n'entraîne pas d'altération de la mémoire de reconnaissance. Par conséquent, d'autres régions cérébrales permettent la récupération du souvenir de l'objet familier dans le test du NOP (Haettig et al. 2011; Vogel-Ciernia et Wood 2014). Les voies moléculaires impliquées dans les deux types de mémoires sont donc distinctes et contrairement à la L41, l'EMD10 agit sur les mécanismes moléculaires du processus de mémoire spatiale à long terme.

Concernant le dosage d'activité kinase de DYRK1A suite au traitement des souris Tg(*Dyrk1a*) avec l'EMD10 pendant 19 jours, les analyses montrent que les souris Tg(*Dyrk1a*) non traitées ne présentent pas d'augmentation de l'activité de DYRK1A par rapport aux animaux contrôles. Ces résultats ne concordent pas avec les études faites chez ces mêmes souris pour lesquelles le Dr. Nguyen a trouvé une augmentation de l'activité kinase de DYRK1A (Nguyen et al., 2018). Néanmoins, la mesure du niveau de phosphorylation de TAU par DYRK1A en Ser205/Thr205 et le profil d'activité de DYRK1A mesuré avec la technologie de PamChip ont tous deux montré une augmentation de l'activité kinase de DYRK1A chez les souris Tg(*Dyrk1a*) non traitées par rapport aux souris contrôles. Le fait de ne pas avoir vu d'augmentation de

l'activité kinase dans le test de dosage de l'activité catalytique semble provenir d'un problème technique. En effet, lors de l'analyse du dosage d'activité catalytique de DYRK1A pour l'étude de l'EMD173 chez les souris Dp1Yey, l'absence de la suractivité de DYRK1A chez les souris Dp1Yey par rapport aux contrôles avait aussi été observée, amenant à refaire le dosage à partir des mêmes échantillons. Au cours du premier dosage, les conditions de mesure de la vitesse initiale (vitesse à l'état stationnaire) qui correspond à la vitesse au début de la réaction enzymatique, n'ont pas pu être vérifiées. Or les conditions d'obtention de la vitesse initiale sont dépendantes des conditions expérimentales : concentration de substrats, d'enzymes et température. Cette vitesse initiale est utilisée pour déterminer les constantes de Michaelis caractérisant la réaction enzymatique et donc pour identifier la quantité de protéines à utiliser pour le dosage enzymatique. Le fait de ne pas avoir vérifié la vitesse initiale peut conduire à une surestimation ou sous-estimation des vitesses et donc conduire à une inexactitude des résultats. Le second dosage réalisé avec vérification de la vitesse initiale a permis de mettre en évidence, comme attendu, une augmentation d'activité catalytique de DYRK1A chez les souris Dp1Yey. Le dosage kinase de l'étude de l'EMD10 chez les souris Tg(*Dyrk1a*) a été effectué au même moment que celui que l'étude de l'EMD173 sur les souris Dp1Yey. Par conséquent, l'analyse sera réitérée afin de valider les résultats obtenus. Il faut également noter que la technique du dosage d'activité kinase au cours de ce projet repose sur la séparation et la quantification de peptides fluorescents spécifiques (substrat et produit phosphorylé) par HPLC. Le dosage catalytique réalisé par le Dr. Nguyen est basé sur une méthode d'utilisation d'ATP marqué radioactif comme donneur de phosphate et la détection par scintigraphie du phosphate incorporé dans les substrats peptidiques. Cette technique radiométrique simple, permet la détection d'activité kinase de DYRK1A avec une sensibilité élevée (Nguyen et al., 2018). L'inconvénient majeur de cette technique est l'utilisation isotopes radioactifs de phosphates (^{33}P), c'est pourquoi nous avons décidé de réaliser les études kinases avec la première technique citée. Aux vues des différences des résultats obtenus au cours de notre projet et qui ne concordent pas avec ceux de la littérature, il serait préférable de revenir sur la technique de dosage par radioactivité.

Concernant la seconde étude réalisée chez les souris Tg(*Dyrk1a*) avec l'EMD10, nous avons voulu étudier l'efficacité du composé sur les fonctions mnésiques des souris Tg(*Dyrk1a*) après 10 jours de traitement (Nguyen et al., 2018). Les résultats obtenus montrent que l'EMD10

permet une correction totale des fonctions mnésiques après seulement 10 jours de traitements contre 12 jours pour la L41. Dans le cadre de cette deuxième étude réalisée chez le modèle Tg(*Dyrk1a*), l'activité de DYRK1A n'a malheureusement pas été vérifiée et les résultats ne peuvent donc pas être comparés à ceux de l'étude de la L41 qui présentent une normalisation de l'activité kinase de DYRK1A après 12 jours de traitements. Par conséquent, il serait intéressant de doser l'activité catalytique de DYRK1A afin de comparer les résultats de 10 jours de traitements avec l'EMD10 contre 12 jours avec la L41 (Nguyen et al., 2018).

En complément, l'analyse de PamChip met en évidence des modifications importantes du kinome chez les souris Tg(*Dyrk1a*) traitées avec l'EMD10 pendant 19 jours. En effet, 70% (7 sur 10) des kinases suractivées chez les souris Tg(*Dyrk1a*) sont normalisées suite au traitement de 19 jours à l'EMD10. De plus, 87.5% (28 sur 32) des kinases sous-activées chez les souris Tg(*Dyrk1a*) sont également normalisées grâce au traitement avec la Leucettinib. L'analyse grâce à la base de données MetaCore des interactions entre kinases dont l'activité est modifiée dans le cerveau des souris Tg(*Dyrk1a*) par rapport au souris contrôles et dont l'activité revient à la normale dans le cerveau des souris Tg(*Dyrk1a*) traitées à l'EMD10 a permis de mettre en évidence trois kinases, ASK1, B-RAF ainsi que ROCK qui interagissent directement avec DYRK1A et dont les interactions avec le reste des kinases dérégulées dans l'analyse seraient donc à l'origine des modifications du kinome. Ces résultats sont uniquement des hypothèses nécessitant des analyses supplémentaires afin de valider ces interactions. Dans un premier temps, il est nécessaire de vérifier les activités de ASK1, B-RAF et ROCK par quantification de la phosphorylation de cibles connues de ces kinases. Par la suite, des études complémentaires devront être réalisées en fonction des rôles de ASK1, BRAF et ROCK et des voies de signalisations dans lesquelles ses kinases sont impliquées, comme décrit ci-dessous.

ASK1, faisant partie de la famille des MAP kinases, phosphoryle et active les voies des kinases p38 et JNK (« c-Jun N-terminal kinase ») (Ichijo et al. 1997). ASK1 peut favoriser l'apoptose en réponse à des stress pro-apoptotiques courants, tels que le stress oxydatif (J. Song et al. 2014), ou le stress du réticulum endoplasmique (Nishitoh et al. 2002) et cela par l'activation de la voie de signalisation JNK (H. K. Choi et Chung 2011) DYRK1A phosphoryle ASK1 régulant positivement le signal JNK pendant la mort cellulaire dépendante de la voie de signalisation JNK1-ASK1 (H. K. Choi et Chung 2011). Dans ce contexte DYRK1A serait alors pro-apoptotiques. Des études montrent que DYRK1A est également anti-apoptotiques notamment

via la régulation de l'activité de la caspase 9 qui est essentielle dans les voies apoptotiques intrinsèque ou mitochondriale (Seifert, Allan, et Clarke 2008; Laguna et al. 2008). Par conséquent, DYRK1A serait impliquée dans la régulation de l'apoptose via les deux voies de signalisation (Figure 79). Il serait donc intéressant de vérifier le niveau de phosphorylation de ASK1 en Thr845 ainsi que de la caspase 9 en Thr125 dans nos modèles souris Tg(*Dyrk1a*) et contrôles traitées ou non avec l'EMD10. Les résultats permettront de vérifier si le traitement aux Leucettinibs conduit à une modification de l'activité de ses voies de signalisations.

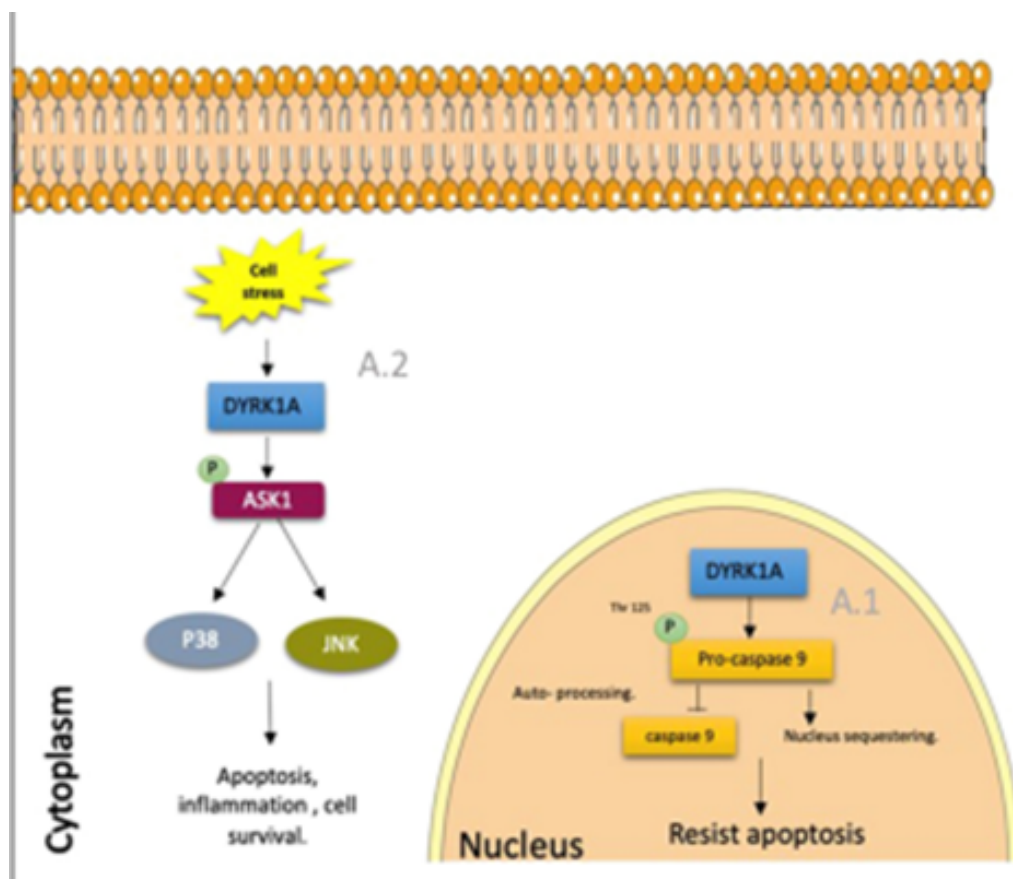


Figure 79 : Rôle de DYRK1A dans l'apoptose

A.1. DYRK1A phosphoryle la procaspase 9 en Thr125 dans le noyau, empêchant son auto-traitement et sa localisation dans le cytoplasme, ce qui conduira à une résistance à l'apoptose.

A.2. Sous stress cellulaire, DYRK1A phosphoryle ASK1 ce qui conduira à son activation et phosphorylation JNK et P38 entraînant l'apoptose, l'inflammation ou la survie cellulaire (Laham, Saber-Ayad, et El-Awady 2021).

Alors qu'une signalisation dépendante de Ras est nécessaire pour favoriser ou maintenir la différenciation neuronale, DYRK1A module l'activation de ERK en interagissant avec Ras, B-Raf et MEK1 et en facilitant la formation d'un complexe multiprotéique Ras/B-Raf/MEK1 favorisant la croissance des neurites (Kelly et Rahmani 2005). De plus, ROCK est un régulateur du cytosquelette d'actine et un effecteur en aval de RHOA dans la voie de signalisation RHO/ROCK qui est nécessaire pour l'excroissance des neurites (McBeath et al. 2004). La dérégulation de cette voie conduit à des déficiences intellectuelles associées à l'altération de la structure dendritique des neurones (Ramakers 2002). Chez les souris Tg(*Dyrk1a*), une augmentation des épines dendritiques conduisant à des perturbations de l'activité synaptique du cortex préfrontal a été démontrée (Thomazeau et al., 2014). L'analyse de l'impact de l'EMD10 sur la morphologie dendritique pourrait être vérifiée avec un marquage Dil (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'- tetramethylindocarbocyanine perchlorate) permettant de visualiser l'architecture neuronale (Cheng, Trzcinski, et Doering 2014). Par ailleurs, une analyse approfondie de l'expression des gènes mal régulés dans l'hippocampe de modèles souris du SD, et impliqués dans le dysfonctionnement synaptique, a mis en évidence des cascades biologiques qui sont étroitement liées ainsi que centrées autour de DYRK1A et RHOA (Duchon et al., 2021). D'après ces résultats et ceux que nous avons obtenus grâce à la technologie de PamChip, la quantification de la voie de signalisation RHOA/ROCK, semble primordiale chez les souris Tg(*Dyrk1a*) afin d'analyser l'impact du traitement et donc de l'inhibition de DYRK1A sur cette voie.

L'EMD92, une Leucettinib similaire à la L41 ?

L'EMD92 est un second dérivé de L41 présentant un bien meilleur IC50 pour la kinase DYRK1A (1.2 nM) que l'EMD10 (IC50 de 20.3 nM) et la L41 (IC50 de 24.6 nM). Nos travaux ont montré que l'EMD92, administré à une dose dix fois plus faible que l'EMD10, permet le rétablissement des fonctions mnésiques des souris Tg(*Dyrk1a*) et cela dès le 5^{ème} jour de traitement avec une correction de la mémoire de travail évaluée par la tâche du labyrinthe en Y. Contrairement à la L41 qui ne corrige pas le pourcentage d'alternance spontanée des souris Tg(*Dyrk1a*), l'EMD92 doit probablement agir sur les mécanismes moléculaires sous-jacents à la mémoire de travail, en particulier au niveau de l'hippocampe et du cortex préfrontal qui sont deux structures impliquées dans cette mémoire (Kraeuter, Guest, et Sarnyai 2019). De façon similaire à l'EMD10, l'EMD92 corrige également la mémoire spatiale à long terme et la mémoire

de reconnaissance d'objets chez les souris Tg(*Dyrk1a*) avec 10 jours de traitements. Ces résultats démontrent une meilleure efficacité de l'EMD92 par rapport à la L41 avec une correction des fonctions mnésiques dès 5 jours de traitements – contre 12 jours pour la L41 – et à une dose beaucoup plus faible (0.3 mg/kg contre 20 mg/kg). En effet, la L41 testée sur les souris Tg(*Dyrk1a*) pendant 5 jours de traitements à 20 mg/kg ne permet pas une correction totale des fonctions mnésiques de ces souris (Nguyen et al. 2018). Nous avons ensuite testé l'EMD92 sur un modèle plus complet du SD : le modèle souris Dp1Yey. L'effet bénéfique de 10 jours de traitements avec l'EMD92 a été démontré chez ce modèle avec une correction de la mémoire de reconnaissance d'objet évaluée avec le test du NOP. La mémoire de travail et la mémoire de l'emplacement de l'objet, respectivement testées avec le labyrinthe en Y et l'OPP, ne révèlent pas déficit chez les souris Dp1Yey. Concernant les capacités de mémoire de travail, des différences ont déjà été observées chez les souris Dp1Yey. En effet, une diminution du pourcentage d'alternance spontanée et donc un déficit de mémoire de travail est mise en évidence par deux études dont l'une réalisée par notre laboratoire (Souchet et al. 2019; Duchon et al. 2021). Néanmoins, une autre étude ne montre – comme dans notre étude – aucune différence entre les souris Dp1Yey et les souris contrôles concernant la mémoire de travail (Goodliffe et al. 2016). Ces différences ne peuvent pas être expliquées par la variabilité des protocoles, car celui utilisé par le Dr. Duchon est le protocole standard de l'équipe du Dr. Hérault et donc celui utilisé dans notre projet notamment concernant la durée de 8 min du test ainsi que l'identification d'une entrée dans un bras (les quatre pattes de la souris doivent être dans le bras pour considérer une entrée) (Duchon et al. 2021). Nous pouvons tout de même noter une différence entre l'étude du Dr. Duchon et la notre : l'âge des souris Dp1Yey. Alors que nos études de traitements ont été réalisées sur des animaux âgés de 9-12 semaines au début des études, l'étude du Dr. Duchon a été effectuée sur des animaux âgés entre 2.5 à 7 mois. L'âge des souris pourrait en partie expliquer les différences des résultats obtenus. À notre connaissance, la mémoire spatiale à long terme des souris Dp1Yey n'a jamais été évaluée avec le test de l'OPP. Notre étude met en évidence que le modèle Dp1Yey ne présente pas de déficit de la mémoire de localisation d'objet. Sachant que les souris Tg(*Dyrk1a*) ont une altération de leur mémoire de l'emplacement d'objet, cela suggère que l'un ou plusieurs des gènes trisomiques chez le modèle Dp1Yey corrigent l'altération de la mémoire de localisation d'objet provenant de la trisomie du gène *Dyrk1a*.

Impact de l'EMD92 sur l'activité cérébrale des souris Dp1Yey

Les études précédentes de notre laboratoire en collaboration le Dr. Laura Harsan de l'iCUBE ont révélé que l'amélioration cognitive des souris Dp1Yey avec le traitement à la L41 s'accompagne d'un remodelage de la connectivité fonctionnelle. Cet effet est observé par rs-fMRI dans les régions centrales du cerveau impliquées dans les processus des fonctions mnésiques. En effet, de fortes modifications de la connectivité fonctionnelle chez les souris Dp1Yey traitées avec la L41 par rapport aux non traitées ont été mises en évidence dans les zones corticales et préfrontales (le cortex cingulaire antérieur et les zones préfrontales) ainsi que dans les régions de l'hippocampe, du pallidum et du thalamus (Nguyen et al. 2018). Dans notre projet, nous avons aussi réalisé une analyse de morphométrie afin de caractériser le phénotype des souris Dp1Yey non traitées par rapport aux souris sauvages. Cette étude a mis en évidence des altérations morphologiques à l'échelle du cerveau chez les souris Dp1Yey avec des dommages au niveau du volume cortical (cortex frontal et sensoriel) et sous-cortical (thalamus, striatum et hippocampe). Une autre analyse de l'imagerie du tenseur de diffusion permettant d'évaluer la connectivité structurale, a révélé des changements dans la substance blanche (le faisceau de cingulum, le corps calleux et la capsule externe). La surexpression de DYRK1A pourrait expliquer au moins en partie ces modifications morphologiques car elle joue un rôle crucial au cours du développement neurologique (Arbones et al. 2019). De plus, la rs-fMRI a montré que l'inhibition pharmacologique de DYRK1A modifie la connectivité fonctionnelle cérébrale générale chez les souris Dp1Yey mais aussi celle des structures liées à la mémoire, tels que cortex frontal et l'hippocampe. Ces modifications sont en synergie avec les améliorations cognitives observées dans le test du NOP. L'analyse de l'IRMf est toujours en cours par l'équipe du Dr. Laura Harsan. Des études complémentaires permettront de mieux comprendre ces changements fonctionnels ainsi que d'extraire des réseaux spécifiquement modifiés par le traitement.

L'EMD173, une leucettinib *a contrario*

L'EMD173 corrige les fonctions cognitives du modèle souris Dp1Yey sans pour autant normaliser l'activité catalytique de DYRK1A

L'EMD173, la Leucettinib sélectionnée par nos collaborateurs pour de futures études cliniques a été testée sur modèle Dp1Yey avec 10 jours de traitements à deux doses : 3 et 0.3 mg/kg/jour. Pour les deux doses, l'efficacité de l'EMD173 a été démontrée avec une correction des déficits mnésiques évaluée dans le test du NOP. Le dosage de l'activité de DYRK1A chez les souris Dp1Yey montre que l'EMD173 ne parvient pas à normaliser ni même à seulement diminuer l'activité kinase de DYRK1A. En outre, les résultats révèlent même une augmentation de l'activité de notre kinase chez les souris Dp1Yey traitées avec deux doses d'EMD173 (3 et 0.3 mg/kg/jour). Les résultats obtenus avec l'EMD173 chez les souris Dp1Yey soulèvent donc des questions sur le fonctionnement et le mode d'action de cette Leucettinib. Il est possible que l'EMD173 agisse bien sur l'activité kinase de DYRK1A mais que l'action dans le temps et donc la pharmacocinétique de l'EMD173 soit différente des autres Leucettinibs. Les études de pharmacocinétique et de bio-distribution de la L41 ont montré que sa concentration dans le cerveau, atteint son maximum (0.23 nmol/cerveau) 20 min après une administration intrapéritonéale chez les souris Tg(*Dyrk1a*) et contrôles. La L41 disparaît totalement du cerveau 24 heures après l'injection. Si la pharmacocinétique de l'EMD10 et l'EMD92 sont similaires à celle de la L41, nous pouvons supposer que celle de l'EMD173 est différente et que ce composé est probablement métabolisé plus rapidement. Afin de valider cette hypothèse, une étude de pharmacocinétique couplée à des dosages d'activité kinase de DYRK1A devront être réalisés sur les deux génotypes. Cela devra être effectué avec une dose fixe de la Leucettinib et les animaux seront sacrifiés à différents temps après administration du traitement, par exemple après 20 min, 30 min, 1 heure, 2 heures, 4 heures, 8 et 24 heures. En plus d'un dosage de l'EMD173 dans le plasma et le cerveau des animaux aux différents temps, un dosage d'activité de DYRK1A pourra être effectué afin d'identifier si une normalisation de son activité est induite, à quel intervalle de temps après le traitement cela se produit et si l'inhibition de DYRK1A par l'EMD173 disparaît après un moment donné. Par ailleurs, la rémanence de la L41 a été testée à 24 heures et 48 heures après un arrêt de traitement de 19 jours. Les résultats montrent que l'activité catalytique des souris Tg(*Dyrk1a*) reste inhibée par la L41 24 heures après le dernier

traitement et cela est corrélé avec une correction de la mémoire de reconnaissance d'objet. L'impact de la L41 sur l'activité kinase de DYRK1A disparaît 48 heures après la dernière dose de L41 et les souris Tg(*Dyrk1a*) traitées ne présentent plus de rétablissement de leur mémoire de reconnaissance d'objet (Nguyen et al. 2018). Sachant que dans notre cas, la correction des fonctions mnésiques n'est pas corrélée à une inhibition de l'activité kinase de DYRK1A chez les souris Dp1yey traitées avec l'EMD173 pendant 10 jours, il semblerait que le fonctionnement de l'EMD173 soit différent de celui de la L41. En effet, si l'EMD173 est métabolisé plus rapidement, son action d'inhibition de DYRK1A sera donc plus courte. D'après nos résultats, cette inhibition plus courte serait suffisante pour corriger la mémoire de reconnaissance d'objet des souris Dp1Yey. Cependant, le point essentiel est de valider l'activité de DYRK1A par une autre méthode. En effet, il est primordial de vérifier l'impact de l'EMD173 sur des substrats phosphorylés *in vivo*. Il faudrait réaliser des quantifications du niveau de phosphorylation de cibles connues de DYRK1A telle que la protéine TAU par exemple en Thr212 ou Ser202/Thr205 (Ryoo et al. 2007; Liu et al. 2008). Enfin, il faut aussi souligner que les dosages d'activité kinase de DYRK1A n'ont pas été réalisés avec la même technique pour ceux de notre projet et ceux des études de la L41. Il serait donc intéressant de vérifier l'activité de DYRK1A chez les souris traitées à l'EMD173 avec le test de radioactivité.

Concernant l'analyse de l'activité du profil du kinome chez les souris Dp1Yey traitées 10 jours avec l'EMD173, les résultats n'ont pas été reproductibles vis-à-vis de la première étude réalisée avec le système PamChip (Tg(*Dyrk1a*) traitées avec l'EMD10 pendant 19 jours). Alors que l'activité de DYRK1A a été détectée avec la technologie PamChip pour la première étude, aucune activité n'a été relevée par ce même système pour la présente étude. Cette méthode, ne nous permet pas de valider l'impact de l'EMD173 sur l'activité de DYRK1A, ni même de vérifier si les souris Dp1Yey non traitées présentent bien une augmentation de l'activité catalytique de DYRK1A. Ces résultats sont peut-être à l'origine d'erreur technique au cours de l'expérience et sont donc à prendre avec précaution.

Impact de l'EMD173 chez les modèles rats du SD

L'EMD173 a été testée sur les modèles rats Dup(Rno11)-APP^{H3} et Dup(Rno11-20)-APP^{H3}. Le test de la piscine de Morris a été utilisé pour mesurer l'impact de l'EMD173 sur les fonctions mnésiques de ces modèles. Les résultats ont montré une amélioration mais sans pour autant un rétablissement complet de la mémoire spatiale à long terme des rats Dup(Rno11-20)-APP^{H3},

mais pas aucune amélioration n'a été observée sur le modèle partiel Dup(Rno11)-APP^{H3}. De plus, aucun effet sur l'apprentissage spatial à long terme n'a été observé suite au traitement de 12-13 jours avec l'EMD173. Ces résultats sont surprenants car du fait de la plus grande complexité génétique du modèle Dup(Rno11-20)-APP^{H3} – présentant une trisomie des régions des Rno11 et Rno20 synténiques au Hsa21 –, il aurait été plus probable que dans un premier temps, le traitement conduise à une amélioration des fonctions cognitives des rats Dup(Rno11)-APP^{H3} présentant une trisomie uniquement de la région du Rno11 synténique au Hsa21 et contenant le gène *Dyrk1a*. Par ailleurs, l'analyse du dosage d'activité de DYRK1A ne révèle aucune diminution de la suractivité de DYRK1A chez les deux modèles rats du SD traités avec l'EMD173. Mais comme cela a déjà été discuté, la mesure d'activité kinase de DYRK1A doit être validée par une autre technique, notamment en quantifiant le niveau de phosphorylation d'une cible connue de DYRK1A telle que la protéine TAU. Afin d'expliquer l'absence de correction des fonctions mnésiques chez les modèles rats du SD, nous avons deux hypothèses. La première repose sur la Leucettinib sélectionnée qui n'est peut-être pas adaptée aux modèles rats du SD. Afin de vérifier cette hypothèse, une autre Leucettinib devrait être testée sur ces mêmes modèles. Néanmoins, un effet bénéfique sur la mémoire spatiale à long terme des rats Dup(Rno11-20)-APP^{H3} est tout de même mis en évidence avec un traitement à l'EMD173. Par conséquent, la seconde hypothèse concernant la posologie du traitement semble plus probable. La dose et/ou la durée du traitement sont probablement trop faibles pour obtenir une correction des fonctions mnésiques chez ces deux modèles rats du SD. Des études de traitements supplémentaires devront être réalisées en augmentant l'un des deux paramètres afin de vérifier cette hypothèse.

Impact des Leucettinibs sur l'activité locomotrice des souris *Tg(Dyrk1a)* et *Dp1Yey* mesurée dans les tests du champ ouvert et du labyrinthe en Y

Au cours de ce projet, l'analyse de l'activité locomotrice des souris *Dp1Yey* mesurée avec le test du champ ouvert et le labyrinthe en Y ne montre pas de déficit ni d'effet du traitement (EMD92 et EMD173). Concernant les souris *Tg(Dyrk1a)*, les résultats sont plus instables. L'étude de 19 jours de traitement révèle une diminution de l'activité locomotrice

chez les souris *Tg(Dyrk1a)* traitées avec l'EMD10 au deuxième jour du test du champ ouvert. Ces résultats pourraient refléter une hypoactivité chez les souris *Tg(Dyrk1a)* induit par le traitement à l'EMD10. Par ailleurs, la seconde étude avec l'EMD10 met en évidence une augmentation de l'activité locomotrice des souris *Tg(Dyrk1a)* non traitées au premier jour du test du champ ouvert reflétant une hyperactivité des souris pendant l'habituation au nouvel environnement. Cette hyperactivité est corrigée grâce au traitement à l'EMD10. De plus, une augmentation de l'activité locomotrice des souris *Tg(Dyrk1a)* non traitées est aussi soulignée dans la tâche du labyrinthe en Y. Cette hyperactivité est également corrigée par l'EMD92 après 5 jours de traitements. Par ailleurs, les études sur le modèle *Tg(Dyrk1a)* mettent en évidence une augmentation du nombre de bras visités dans la tâche du labyrinthe en Y ainsi qu'une augmentation de la distance parcourue dans le test du champ ouvert reflétant ainsi une hyperactivité des souris *Tg(Dyrk1a)* (Duchon et al. 2021). Les tests du champ ouvert et du labyrinthe en Y permettent l'évaluation de l'activité locomotrice générale. Néanmoins, le test du champ ouvert est plus anxiogène que la tâche du labyrinthe en Y, l'activité locomotrice évaluée dans ce test peut donc être influencée par l'anxiété générée (Logue et al. 1997). Par conséquent, l'hypoactivité des souris *Tg(Dyrk1a)* traitées dans le test du champ ouvert au cours de la première étude de traitement provient potentiellement du stress généré par le test chez les souris *Tg(Dyrk1a)* traitées avec l'EMD10. Toutefois, nous n'avons pas observé de différence de temps passé en périphérie et au centre du champ ouvert, qui est un indice d'anxiété (données non présentées). Afin de confirmer ce comportement anxiogène un test tel que labyrinthe en croix surélevé devrait être effectué pour mieux évaluer ce paramètre.

Impact des Leucettinibs sur les animaux contrôles

Les études de traitement réalisées avec les trois Leucettinibs – l'EMD10, l'EMD92 et l'EMD173 – ont toutes mises en évidence que l'utilisation de ces inhibiteurs n'impacte pas les fonctions mnésiques et non-mnésiques des animaux contrôles. De plus, la majorité des études ont montré que les Leucettinibs n'ont également pas d'effet sur l'activité catalytique de DYRK1A chez les souris et rats contrôles. Ces résultats sont similaires à ceux des études du Dr. Nguyen : l'administration de la L41 chez les animaux sauvages n'affectent ni leur mémoire de reconnaissance d'objet, ni l'activité catalytique de DYRK1A (Nguyen et al., 2018). Néanmoins,

une diminution de l'activité de DYRK1A est observée chez les souris contrôles traitées avec l'EMD10 pendant 19 jours à une dose de 3 mg/kg. Ces résultats peuvent refléter un mécanisme d'action différent de l'EMD10 par rapport aux autres Leucettinibs et la L41. Cela peut provenir d'une bio-distribution de l'EMD10 différente chez les souris transgéniques par rapport aux contrôles. Dans le but de confirmer cette hypothèse, une étude de bio-distribution de ce composé devrait être réalisée chez les deux génotypes. En revanche, il faut noter que l'analyse de phosphorylation de TAU par DYRK1A en Ser205/Thr205 ainsi que celle du profil d'activité de DYRK1A ne montre pas d'effet de l'EMD10 sur l'activité kinase de DYRK1A chez les souris contrôles après 19 jours de traitements. D'après nos études, il paraît tout de même inadéquat de stipuler que les Leucettinibs n'affectent pas les souris contrôles. En effet, l'analyse de l'activité du kinome des souris contrôles traitées avec l'EMD10 révèle des variations par rapport aux souris non traitée : l'EMD10 induit une augmentation de l'activité de 19 kinases et une diminution de 11 kinases dont GSK3 β . Ces modifications du kinome peuvent provenir d'une action directe ou indirecte du traitement sur l'activité de ces kinases. Par exemple, l'activité de la kinase GSK3 β est régulée par la phosphorylation en Thr356 médiée par DYRK1A conduisant ainsi à l'inhibition de l'activité de GSK3 β (W.-J. Song et al. 2015). Si l'EMD10 induit une diminution d'activité de DYRK1A chez les souris contrôles, nous pourrions supposer que cela conduirait à une augmentation de l'activité de GSK3 β . Toutefois nos résultats soulignent à un effet inverse avec une diminution de l'activité de la kinase GSK3 β chez les souris contrôles.

Ces résultats mettent clairement en évidence un effet des Leucettinibs sur l'activité du kinome ainsi que la connectivité cérébrale des souris sauvages. Néanmoins, aucune répercussion n'a été rapportée sur les fonctions mnésiques et non mnésiques des souris et rats au cours de ce projet.

Traitements aux Leucettinibs chez le modèle rat Dup2(*Dyrk1a*)

Au cours de ce projet nous voulions étudier l'impact des Leucettinibs sur les modèles rats du SD dans le but de valider leur efficacité sur une autre espèce que la souris avant un passage en essai clinique. L'EMD173 a donc été testé sur les modèles rats du SD : Dup(Rno11)-APP^{H3} et Dup(Rno11-20)-APP^{H3}. Du fait de la complexité de ces modèles il serait plus judicieux de valider dans un premier temps l'impact des Leucettinibs sur l'activité kinase de DYRK1A chez

le rat sur un modèle génétiquement plus simple que les deux modèles cités précédemment. Le modèle rat Dup2(*Dyrk1a*) qui a été validé et caractérisé dans le premier projet de cette thèse paraît le plus adéquat. En effet, ce modèle présentant uniquement une trisomie du gène *Dyrk1a*, permettra de corréliser la correction des fonctions cognitives via la normalisation de l'activité catalytique de DYRK1A. Une étude de traitement aux Leucettinibs sur le modèle Dup2(*Dyrk1a*) devra toutefois attendre les résultats du dosage kinase de DYRK1A.

Afin d'adapter un futur traitement aux Leucettinibs chez le modèle rat Dup2(*Dyrk1a*), une étude de l'action de la drogue sur l'activité catalytique de DYRK1A devrait être réalisée. Cela devrait être effectué avec une ou différentes doses de Leucettinibs et les rats seront sacrifiés à différents temps après l'administration du traitement. Un dosage d'activité de DYRK1A pourra alors être effectué afin d'identifier si une normalisation de son activité est induite et à quel intervalle de temps cela se produit. La posologie du traitement pour l'étude de l'impact des Leucettinibs sur les fonctions des rats Dup2(*Dyrk1a*) sera fixée à partir de l'analyse de la pharmacocinétique. Les tests comportementaux soulignant les déficits de mémoire des rats Dup2(*Dyrk1a*) sont similaires à ceux utilisés chez les souris Tg(*Dyrk1a*). Ainsi, les rats Dup2(*Dyrk1a*) présentent des déficits dans le test de l'OPP avec 5 min rétention (mémoire spatiale à court terme) et la tâche du NOP avec 24 heures de rétention (mémoire de reconnaissance).

Pour finir, nos collaborateurs de Perha Pharmaceuticals ont synthétisé un isoforme sous forme inactive de l'EMD173. Une étude de l'impact de ce composé chez les rats Dup2(*Dyrk1a*) à la même dose que l'EMD173 permettrait de vérifier que ce composé n'induit pas d'effet chez les rats contrôle et Dup2(*Dyrk1a*). Cette analyse permettra également de contrôler que la correction des déficits mnésiques et la normalisation de l'activité de DYRK1A est la conséquence d'une inhibition de DYRK1A et non d'une interaction entre DYRK1A et la Leucettinib.

Projet III : Identification de potentiels partenaires protéiques de DYRK1A chez le modèle souris

Au cours de ce projet nous avons validé le « pull-down » de DYRK1A à partir du modèle souris *Dyrk1a^{ost/ost}* couplé à une chromatographie d'affinité en utilisant le système Strep-Tag. Les western blot et la spectrométrie de masse ont confirmés la présence de DYRK1A dans les fractions d'éluions provenant de la colonne *Dyrk1a^{ost/ost}* ainsi que son absence dans les fractions d'éluions de la colonne contrôle. Le fonctionnement du « pull-down » a également été confirmé par l'analyse de spectrométrie de masse révélant la présence d'interacteurs protéiques connus de DYRK1A.

L'analyse de spectrométrie de masse a permis d'identifier 14 protéines connues et 59 protéines non connues comme interacteurs de DYRK1A. Des études futures devront être réalisées dans le but de valider les interactions entre DYRK1A et les potentiels partenaires protéiques. Dans un premier temps, des western blot dirigés contre les potentiels partenaires de DYRK1A peuvent être effectués sur les fractions d'éluions 2 et 3 du « pull-down ». Les résultats permettront de confirmer les données de la spectrométrie de masse et donc la présence des protéines dans les fractions d'éluions. Dans un second temps, des co-immunoprécipitations de DYRK1A et de ses potentiels interacteurs protéiques devront être réalisées. La présence de DYRK1A doit être confirmée dans l'immunoprécipitation du potentiel partenaire et vice versa.

Parmi les 59 protéines identifiées comme potentiels interacteurs de DYRK1A, cinq protéines sont localisées dans les trois compartiments neuronaux comme DYRK1A (Wegiel et al. 2004) : SOD1 (« *Superoxide dismutase 1* », UCHL1 (« *Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1* »), CALB1 (« *Calbindin 1* »), PVALB (« *Parvalbumin* ») ainsi que GDI1 (« *Rab GDP dissociation inhibitor alpha* »). Des études futures pourraient être réalisées notamment concernant l'interaction de DYRK1A et de SOD1 qui est impliquée dans la régulation du stress oxydatif et dont le gène est aussi localisé sur le Hsa21. L'expression anormale de SOD1 conduit à une augmentation du stress oxydatif endommageant ainsi les cellules, par conséquent la trisomie du gène de SOD1 dans le SD induit à l'apparition de phénotypes (Lanzillotta et Di Domenico 2021). De plus, il serait aussi intéressant d'analyser une possible interaction entre DYRK1A et la protéine GDI1 dont la mutation conduit à un retard mental (D'Adamo et al. 2021). En effet,

GDI1 régule la réaction d'échange GDP-GTP des protéines de la famille Rab impliquées dans la fusion vésiculaire ainsi que le trafic intracellulaire et le knock-out du gène *Gdi1* chez la souris, conduit à altération des fonctions mnésiques (D'Adamo et al. 2021).

Le *pull-down* de DYRK1A a permis d'identifier de potentiels nouveaux partenaires. Cependant une analyse plus approfondie sera nécessaire pour confirmer les interactions protéines-protéines ou de nouvelles cibles de phosphorylation de DYRK1A dans cette liste de 59 protéines.

Conclusion

Au cours de ce projet, nous avons validé et caractérisé de nouveaux modèles rats présentant une haplo-insuffisance ou une trisomie du gène *Dyrk1a* respectivement *Del(Dyrk1a)* et *Dup2(Dyrk1a)*. Les déficits comportementaux soulignés chez les deux modèles présentent des similitudes à ceux de leurs modèles souris respectifs. Ces deux modèles pourront être mieux caractérisés pour mettre en lumière les mécanismes moléculaires de la perturbation du dosage de DYRK1A chez le rat ainsi que pour des études de potentiels traitements pharmacologiques.

L'ensemble des études des nouveaux inhibiteurs de DYRK1A a permis de valider la forte efficacité des Leucettinibs dans la correction des fonctions mnésiques des modèles de souris de surexpression du gène *Dyrk1a* et du modèle du SD. La diminution de la dose et de la durée des traitements ainsi que les corrections de tous les déficits mnésiques observés chez les modèles souris du SD ont prouvé que les Leucettinibs sont de meilleurs candidats médicamenteux que la L41. En effet, les traitements de 10 jours avec l'EMD10 et l'EMD92 ont permis de corriger les altérations des fonctions cognitives des souris *Tg(Dyrk1a)* et *Dp1Yey* via l'inhibition de l'activité kinase de DYRK1A. Concernant l'étude de l'EMD173, une correction de la mémoire de reconnaissance chez les souris *Dp1Yey* et une amélioration de la mémoire spatiale à long terme chez les rats *Dup(Rno11-20)-APP^{H3}* ont été observées. Toutefois, du fait de l'absence d'impact de l'EMD173 sur l'activité kinase de DYRK1A chez les modèles souris et rats du SD, des études complémentaires d'analyse de l'activité de DYRK1A ainsi que de pharmacocinétique devront être effectuées avant le passage en essai clinique de ce composé.

Pour finir, ces travaux auront aussi permis de mettre en évidence de nouveaux interacteurs protéiques de DYRK1A. Ces potentiels partenaires devront par la suite être étudiés plus en détail dans le but de fournir des preuves solides d'interaction protéines-protéines avec DYRK1A et également vérifier si certaines sont phosphorylées par DYRK1A. Les résultats permettront de mieux comprendre les mécanismes d'action de DYRK1A et par conséquent les voies de signalisations perturbées dans le sous dosage ou le surdosage de la protéine DYRK1A afin d'adapter de potentiels traitements thérapeutiques.

Références

- Ábrahám, Hajnalka, András Vincze, Béla Veszprémi, András Kravják, Éva Gömöri, Gábor G. Kovács, et László Seress. 2012. « Impaired Myelination of the Human Hippocampal Formation in Down Syndrome ». *International Journal of Developmental Neuroscience* 30 (2): 147-58. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2011.11.005>.
- Ahn, Kyoung-Jin, Hey Kyeong Jeong, Han-Saem Choi, Soo-Ryoon Ryoo, Yeon Ju Kim, Jun-Seo Goo, Se-Young Choi, Jung-Soo Han, Ilho Ha, et Woo-Joo Song. 2006. « DYRK1A BAC Transgenic Mice Show Altered Synaptic Plasticity with Learning and Memory Defects ». *Neurobiology of Disease* 22 (3): 463-72. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.12.006>.
- Akirav, I., et M. Maroun. 2005. « Ventromedial Prefrontal Cortex Is Obligatory for Consolidation and Reconsolidation of Object Recognition Memory ». *Cerebral Cortex* 16 (12): 1759-65. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhj114>.
- Altafaj, X. 2001. « Neurodevelopmental Delay, Motor Abnormalities and Cognitive Deficits in Transgenic Mice Overexpressing Dyrk1A (Minibrain), a Murine Model of Down's Syndrome ». *Human Molecular Genetics* 10 (18): 1915-23. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.18.1915>.
- Altafaj, Xavier, Eduardo D. Martín, Jon Ortiz-Abalia, Aitana Valderrama, Cristina Lao-Peregrín, Mara Dierssen, et Cristina Fillat. 2013. « Normalization of Dyrk1A Expression by AAV2/1-ShDyrk1A Attenuates Hippocampal-Dependent Defects in the Ts65Dn Mouse Model of Down Syndrome ». *Neurobiology of Disease* 52 (avril): 117-27. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.11.017>.
- Amaral, David G., Helen E. Scharfman, et Pierre Lavenex. 2007. « The Dentate Gyrus: Fundamental Neuroanatomical Organization (Dentate Gyrus for Dummies) ». In *Progress in Brain Research*, 163:3-790. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63001-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63001-5).
- Anderson, Jeffrey S., Jared A. Nielsen, Michael A. Ferguson, Melissa C. Burbach, Elizabeth T. Cox, Li Dai, Guido Gerig, Jamie O. Edgin, et Julie R. Korenberg. 2013. « Abnormal Brain Synchrony in Down Syndrome ». *NeuroImage: Clinical* 2: 703-15. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2013.05.006>.
- Antonarakis, S. E., M. B. Petersen, M. G. McInnis, P. A. Adelsberger, A. A. Schinzel, F. Binkert, C. Pangalos, O. Raoul, S. A. Slaugenhaupt, et M. Hafez. 1992. « The Meiotic Stage of Nondisjunction in Trisomy 21: Determination by Using DNA Polymorphisms ». *American Journal of Human Genetics* 50 (3): 544-50.
- Antonarakis, Stylianos E., Robert Lyle, Emmanouil T. Dermitzakis, Alexandre Reymond, et Samuel Deutsch. 2004. « Chromosome 21 and Down Syndrome: From Genomics to Pathophysiology ». *Nature Reviews Genetics* 5 (10): 725-38. <https://doi.org/10.1038/nrg1448>.
- Antonarakis, Stylianos E., Brian G. Skotko, Michael S. Rafii, Andre Strydom, Sarah E. Pape, Diana W. Bianchi, Stephanie L. Sherman, et Roger H. Reeves. 2020. « Down Syndrome ». *Nature Reviews Disease Primers* 6 (1): 9. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0143-7>.
- Aranda, Sergi, Ariadna Laguna, et Susana de la Luna. 2011. « DYRK Family of Protein Kinases: Evolutionary Relationships, Biochemical Properties, and Functional Roles ». *The FASEB Journal* 25 (2): 449-62. <https://doi.org/10.1096/fj.10-165837>.
- Arbones, Maria L., Aurore Thomazeau, Akiko Nakano-Kobayashi, Masatoshi Hagiwara, et Jean M. Delabar. 2019. « DYRK1A and Cognition: A Lifelong Relationship ». *Pharmacology & Therapeutics* 194 (février): 199-221. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.09.010>.

- Arqué, Glòria, Vassiliki Fotaki, David Fernández, María Martínez de Lagrán, Maria L. Arbonés, et Mara Dierssen. 2008. « Impaired Spatial Learning Strategies and Novel Object Recognition in Mice Haploinsufficient for the Dual Specificity Tyrosine-Regulated Kinase-1A (Dyrk1A) ». Édité par Wim E. Crusio. *PLoS ONE* 3 (7): e2575. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002575>.
- Arron, Joseph R., Monte M. Winslow, Alberto Polleri, Ching-Pin Chang, Hai Wu, Xin Gao, Joel R. Neilson, et al. 2006. « NFAT Dysregulation by Increased Dosage of DSCR1 and DYRK1A on Chromosome 21 ». *Nature* 441 (7093): 595-600. <https://doi.org/10.1038/nature04678>.
- Atas-Ozcan, Helin, Véronique Brault, Arnaud Duchon, et Yann Herault. 2021. « Dyrk1a from Gene Function in Development and Physiology to Dosage Correction across Life Span in Down Syndrome ». *Genes* 12 (11): 1833. <https://doi.org/10.3390/genes12111833>.
- Austeng, Marit Erna, Harriet Akre, Britt Øverland, Michael Abdelnoor, Eva-Signe Falkenberg, et Kari Jorunn Kværner. 2013. « Otitis Media with Effusion in Children with in Down Syndrome ». *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 77 (8): 1329-32. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2013.05.027>.
- Aylward, Elizabeth H., Qiang Li, Nancy A. Honeycutt, Andrew C. Warren, Margaret B. Pulsifer, Patrick E. Barta, Michael D. Chan, Paige D. Smith, Matthew Jerram, et Godfrey D. Pearson. 1999. « MRI Volumes of the Hippocampus and Amygdala in Adults With Down's Syndrome With and Without Dementia ». *American Journal of Psychiatry* 156 (4): 564-68. <https://doi.org/10.1176/ajp.156.4.564>.
- Baburamani, Ana A., Regina T. Vontell, Alena Uus, Maximilian Pietsch, Prachi A. Patkee, Jo Wyatt-Ashmead, Evonne C. Chin-Smith, et al. 2020. « Assessment of Radial Glia in the Frontal Lobe of Fetuses with Down Syndrome ». *Acta Neuropathologica Communications* 8 (1): 141. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-01015-3>.
- Baddeley, Alan. 2010. « Working Memory ». *Current Biology* 20 (4): R136-40. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.12.014>.
- Barlow, Gillian M, Xiao-Ning Chen, Zheng Y Shi, Gary E Lyons, David M Kurnit, Livija Celle, Nancy B Spinner, et al. 2001. « Down Syndrome Congenital Heart Disease: A Narrowed Region and a Candidate Gene ». *Genetics in Medicine* 3 (2): 91-101. <https://doi.org/10.1097/00125817-200103000-00002>.
- Baxter, L. L. 2000. « Discovery and Genetic Localization of Down Syndrome Cerebellar Phenotypes Using the Ts65Dn Mouse ». *Human Molecular Genetics* 9 (2): 195-202. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.2.195>.
- Becker, L., T. Mito, S. Takashima, et K. Onodera. 1991. « Growth and Development of the Brain in Down Syndrome ». *Progress in Clinical and Biological Research* 373: 133-52.
- Becker, Walter, et Wolfgang Sippl. 2011. « Activation, Regulation, and Inhibition of DYRK1A: Activation, Regulation, and Inhibition of DYRK1A ». *FEBS Journal* 278 (2): 246-56. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07956.x>.
- Belichenko, Pavel V., Eliezer Masliah, Alexander M. Kleschevnikov, Angela J. Villar, Charles J. Epstein, Ahmad Salehi, et William C. Mobley. 2004. « Synaptic Structural Abnormalities in the Ts65Dn Mouse Model of down Syndrome ». *The Journal of Comparative Neurology* 480 (3): 281-98. <https://doi.org/10.1002/cne.20337>.

- Birling, Marie-Christine, Laurence Schaeffer, Philippe André, Loic Lindner, Damien Maréchal, Abdel Ayadi, Tania Sorg, Guillaume Pavlovic, et Yann Hérault. 2017. « Efficient and Rapid Generation of Large Genomic Variants in Rats and Mice Using CRISMERE ». *Scientific Reports* 7 (1): 43331. <https://doi.org/10.1038/srep43331>.
- Bittles, A. H., C. Bower, R. Hussain, et E. J. Glasson. 2007. « The Four Ages of Down Syndrome ». *The European Journal of Public Health* 17 (2): 221-25. <https://doi.org/10.1093/eurpub/ckl103>.
- Bittles, A H, et E J Glasson. 2007. « Clinical, Social, and Ethical Implications of Changing Life Expectancy in Down Syndrome ». *Developmental Medicine & Child Neurology* 46 (4): 282-86. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2004.tb00483.x>.
- Bliss, T. V. P., et G. L. Collingridge. 1993. « A Synaptic Model of Memory: Long-Term Potentiation in the Hippocampus ». *Nature* 361 (6407): 31-39. <https://doi.org/10.1038/361031a0>.
- Book, L., A. Hart, J. Black, M. Feolo, J. J. Zone, et S. L. Neuhausen. 2001. « Prevalence and Clinical Characteristics of Celiac Disease in Downs Syndrome in a US Study ». *American Journal of Medical Genetics* 98 (1): 70-74.
- Borella, Erika, Barbara Carretti, et Silvia Lanfranchi. 2013. « Inhibitory Mechanisms in Down Syndrome: Is There a Specific or General Deficit? » *Research in Developmental Disabilities* 34 (1): 65-71. <https://doi.org/10.1016/j.ridd.2012.07.017>.
- Brault, Véronique, Thu Lan Nguyen, Javier Flores-Gutiérrez, Giovanni Iacono, Marie-Christine Birling, Valérie Lalanne, Hamid Meziane, et al. 2021. « Dyrk1a Gene Dosage in Glutamatergic Neurons Has Key Effects in Cognitive Deficits Observed in Mouse Models of MRD7 and Down Syndrome ». Édité par Santhosh Girirajan. *PLOS Genetics* 17 (9): e1009777. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009777>.
- Brodwall, Kristoffer, Gottfried Greve, Elisabeth Leirgul, Kari Klungsøyr, Henrik Holmstrøm, Stein Emil Vollset, et Nina Øyen. 2018. « The Five-Year Survival of Children with Down Syndrome in Norway 1994-2009 Differed by Associated Congenital Heart Defects and Extracardiac Malformations ». *Acta Paediatrica* 107 (5): 845-53. <https://doi.org/10.1111/apa.14223>.
- Bronicki, Lucas M, Claire Redin, Severine Drunat, Amélie Piton, Michael Lyons, Sandrine Passemard, Clarisse Baumann, et al. 2015. « Ten New Cases Further Delineate the Syndromic Intellectual Disability Phenotype Caused by Mutations in DYRK1A ». *European Journal of Human Genetics* 23 (11): 1482-87. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.29>.
- Bui, Linh C., Laure Tabouy, Florent Busi, Jean-Marie Dupret, Nathalie Janel, Chris Planque, Jean-Maurice Delabar, Fernando Rodrigues-Lima, et Julien Dairou. 2014. « A High-Performance Liquid Chromatography Assay for Dyrk1a, a Down Syndrome-Associated Kinase ». *Analytical Biochemistry* 449 (mars): 172-78. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.12.024>.
- Bull, Marilyn J. 2020. « Down Syndrome ». *The New England Journal of Medicine* 382 (24): 2344-52. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1706537>.
- Bull, Marilyn J. et the Committee on Genetics. 2011. « Health Supervision for Children With Down Syndrome ». *Pediatrics* 128 (2): 393-406. <https://doi.org/10.1542/peds.2011-1605>.
- Bush, Douglas, Csaba Galambos, D. Dunbar Ivy, Steven H. Abman, Kristine Wolter-Warmerdam, et Francis Hickey. 2018. « Clinical Characteristics and Risk Factors for Developing Pulmonary

Hypertension in Children with Down Syndrome ». *The Journal of Pediatrics* 202 (novembre): 212-219.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2018.06.031>.

Campbell, Colin, Oriane Landry, Natalie Russo, Heidi Flores, Sophie Jacques, et Jacob A. Burack. 2013. « Cognitive Flexibility Among Individuals With Down Syndrome: Assessing the Influence of Verbal and Nonverbal Abilities ». *American Journal on Intellectual and Developmental Disabilities* 118 (3): 193-200. <https://doi.org/10.1352/1944-7558-118.3.193>.

Carlesimo, G. A., L. Marotta, et S. Vicari. 1997. « Long-Term Memory in Mental Retardation: Evidence for a Specific Impairment in Subjects with Down's Syndrome ». *Neuropsychologia* 35 (1): 71-79. [https://doi.org/10.1016/s0028-3932\(96\)00055-3](https://doi.org/10.1016/s0028-3932(96)00055-3).

Carter, Rebecca J., Jennifer Morton, et Stephen B. Dunnett. 2001. « Motor Coordination and Balance in Rodents ». *Current Protocols in Neuroscience* 15 (1). <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0812s15>.

Chang, Chih-Chia, et Kuo-Chiang Hsia. 2021. « More than a Zip Code: Global Modulation of Cellular Function by Nuclear Localization Signals ». *The FEBS Journal* 288 (19): 5569-85. <https://doi.org/10.1111/febs.15659>.

Chang, Eric H., et Patricio T. Huerta. 2012. « Neurophysiological correlates of object recognition in the dorsal subiculum ». *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 6. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2012.00046>.

Chang, Lun-Ching, Hui-Min Lin, Etienne Sibille, et George C Tseng. 2013. « Meta-Analysis Methods for Combining Multiple Expression Profiles: Comparisons, Statistical Characterization and an Application Guideline ». *BMC Bioinformatics* 14 (1): 368. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-368>.

Chen, Chun-Kan, Catherine Bregere, Jeremy Paluch, Jason F. Lu, Dion K. Dickman, et Karen T. Chang. 2014. « Activity-Dependent Facilitation of Synaptotagmin and Synaptic Vesicle Recycling by the Minibrain Kinase ». *Nature Communications* 5 (1): 4246. <https://doi.org/10.1038/ncomms5246>.

Chen, Xu-Qiao, Zhuo Xing, Quang-Di Chen, Richard J. Salvi, Xuming Zhang, Benjamin Tycko, William C. Mobley, et Y. Eugene Yu. 2021. « Mechanistic Analysis of Age-Related Clinical Manifestations in Down Syndrome ». *Frontiers in Aging Neuroscience* 13: 700280. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.700280>.

Cheng, Connie, Olivia Trzcinski, et Laurie C. Doering. 2014. « Fluorescent Labeling of Dendritic Spines in Cell Cultures with the Carbocyanine Dye "DiI" ». *Frontiers in Neuroanatomy* 8: 30. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00030>.

Choi, Hyoung Kyung, et Kwang Chul Chung. 2011. « Dyrk1A Positively Stimulates ASK1-JNK Signaling Pathway during Apoptotic Cell Death ». *Experimental Neurobiology* 20 (1): 35-44. <https://doi.org/10.5607/en.2011.20.1.35>.

Choi, Miri, Ae-kyeong Kim, Youngwook Ham, Joo-Youn Lee, Daeyong Kim, Ansook Yang, Min Ju Jo, et al. 2021. « Aristolactam BIII, a Naturally Derived DYRK1A Inhibitor, Rescues Down Syndrome-Related Phenotypes ». *Phytomedicine* 92 (novembre): 153695. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153695>.

Cieuta-Walti, Cécile, Aida Cuenca-Royo, Klaus Langohr, Claire Rakic, Ma Ángeles López-Vílchez, Julián Lirio, Domingo González-Lamuño Leguina, et al. 2022. « Safety and Preliminary Efficacy on Cognitive Performance and Adaptive Functionality of Epigallocatechin Gallate (EGCG) in Children with Down

Syndrome. A Randomized Phase Ib Clinical Trial (PERSEUS Study) ». *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 24 (10): 2004-13.
<https://doi.org/10.1016/j.gim.2022.06.011>.

Cimadomo, Danilo, Gemma Fabozzi, Alberto Vaiarelli, Nicolò Ubaldi, Filippo Maria Ubaldi, et Laura Rienzi. 2018. « Impact of Maternal Age on Oocyte and Embryo Competence ». *Frontiers in Endocrinology* 9 (juin): 327. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00327>.

Contestabile, Andrea, Tatiana Fila, Claudio Ceccarelli, Paola Bonasoni, Laura Bonapace, Donatella Santini, Renata Bartesaghi, et Elisabetta Ciani. 2007. « Cell Cycle Alteration and Decreased Cell Proliferation in the Hippocampal Dentate Gyrus and in the Neocortical Germinal Matrix of Fetuses with down Syndrome and in Ts65Dn Mice ». *Hippocampus* 17 (8): 665-78.
<https://doi.org/10.1002/hipo.20308>.

Contestabile, Andrea, Salvatore Magara, et Laura Cancedda. 2017. « The GABAergic Hypothesis for Cognitive Disabilities in Down Syndrome ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 11 (mars).
<https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00054>.

Courcet, Jean-Benoît, Laurence Faivre, Perrine Malzac, Alice Masurel-Paulet, Estelle Lopez, Patrick Callier, Laetitia Lambert, et al. 2012. « The *DYRK1A* Gene Is a Cause of Syndromic Intellectual Disability with Severe Microcephaly and Epilepsy ». *Journal of Medical Genetics* 49 (12): 731-36.
<https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-101251>.

Courraud, Jérémie, Eric Chater-Diehl, Benjamin Durand, Marie Vincent, Maria del Mar Muniz Moreno, Imene Boujelbene, Nathalie Drouot, et al. 2021. « Integrative Approach to Interpret *DYRK1A* Variants, Leading to a Frequent Neurodevelopmental Disorder ». *Genetics in Medicine* 23 (11): 2150-59. <https://doi.org/10.1038/s41436-021-01263-1>.

Cramer, Nathan, et Zygmunt Galdzicki. 2012. « From Abnormal Hippocampal Synaptic Plasticity in Down Syndrome Mouse Models to Cognitive Disability in Down Syndrome ». *Neural Plasticity* 2012: 1-12. <https://doi.org/10.1155/2012/101542>.

D'Adamo, Patrizia, Anemari Horvat, Antonia Gurgone, Maria Lidia Mignogna, Veronica Bianchi, Michela Masetti, Maddalena Ripamonti, et al. 2021. « Inhibiting Glycolysis Rescues Memory Impairment in an Intellectual Disability *Gdi1*-Null Mouse ». *Metabolism* 116 (mars): 154463.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154463>.

Dang, T, W Y Duan, B Yu, D L Tong, C Cheng, Y F Zhang, W Wu, et al. 2018. « Autism-Associated *Dyrk1a* Truncation Mutants Impair Neuronal Dendritic and Spine Growth and Interfere with Postnatal Cortical Development ». *Molecular Psychiatry* 23 (3): 747-58. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.253>.

Dard, Rodolphe, Manon Moreau, Estelle Parizot, Farah Ghieh, Leslie Brehier, Nadim Kassis, Valérie Serazin, et al. 2021. « *DYRK1A* Overexpression in Mice Downregulates the Gonadotropic Axis and Disturbs Early Stages of Spermatogenesis ». *Genes* 12 (11): 1800.
<https://doi.org/10.3390/genes12111800>.

Daunhauer, Lisa A., Deborah J. Fidler, Laura Hahn, Elizabeth Will, Nancy Raitano Lee, et Susan Hepburn. 2014. « Profiles of Everyday Executive Functioning in Young Children With Down Syndrome ». *American Journal on Intellectual and Developmental Disabilities* 119 (4): 303-18.
<https://doi.org/10.1352/1944-7558-119.4.303>.

De la Torre, Rafael, Susana De Sola, Meritxell Pons, Arnaud Duchon, María Martínez de Lagran, Magí Farré, Montserrat Fitó, et al. 2014. « Epigallocatechin-3-Gallate, a *DYRK1A* Inhibitor, Rescues

Cognitive Deficits in Down Syndrome Mouse Models and in Humans ». *Molecular Nutrition & Food Research* 58 (2): 278-88. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201300325>.

De Strooper, B., M. Simons, G. Multhaup, F. Van Leuven, K. Beyreuther, et C. G. Dotti. 1995. « Production of Intracellular Amyloid-Containing Fragments in Hippocampal Neurons Expressing Human Amyloid Precursor Protein and Protection against Amyloidogenesis by Subtle Amino Acid Substitutions in the Rodent Sequence ». *The EMBO Journal* 14 (20): 4932-38.

Delabar, J. M., D. Theophile, Z. Rahmani, Z. Chettouh, J. L. Blouin, M. Prieur, B. Noel, et P. M. Sinet. 1993. « Molecular Mapping of Twenty-Four Features of Down Syndrome on Chromosome 21 ». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 1 (2): 114-24. <https://doi.org/10.1159/000472398>.

Dembélé, Doulaye. 2019. « Analysis of High-Throughput Biological Data Using Their Rank Values ». *Statistical Methods in Medical Research* 28 (8): 2276-91. <https://doi.org/10.1177/0962280218764187>.

Deng, Changfei, Ling Yi, Yi Mu, Jun Zhu, Yanwen Qin, Xiaoxiao Fan, Yanping Wang, Qi Li, et Li Dai. 2015. « Recent Trends in the Birth Prevalence of Down Syndrome in China: Impact of Prenatal Diagnosis and Subsequent Terminations: Prevalence of Down Syndrome in China and Prenatal Diagnosis ». *Prenatal Diagnosis* 35 (4): 311-18. <https://doi.org/10.1002/pd.4516>.

Dierssen, Mara, Yann Herault, et Xavier Estivill. 2009. « Aneuploidy: From a Physiological Mechanism of Variance to Down Syndrome ». *Physiological Reviews* 89 (3): 887-920. <https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2007>.

Do Carmo, Sonia, et A Cuello. 2013. « Modeling Alzheimer's Disease in Transgenic Rats ». *Molecular Neurodegeneration* 8 (1): 37. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-37>.

Doran, Eric, David Keator, Elizabeth Head, Michael J. Phelan, Ron Kim, Minodora Totoiu, Jorge R. Barrio, Gary W. Small, Steven G. Potkin, et Ira T. Lott. 2017. « Down Syndrome, Partial Trisomy 21, and Absence of Alzheimer's Disease: The Role of APP ». Édité par Juan Fortea. *Journal of Alzheimer's Disease* 56 (2): 459-70. <https://doi.org/10.3233/JAD-160836>.

Dowjat, Wieslaw K., Tatyana Adayev, Izabela Kuchna, Krzysztof Nowicki, Sonia Palmieriello, Yu Wen Hwang, et Jerzy Wegiel. 2007. « Trisomy-Driven Overexpression of DYRK1A Kinase in the Brain of Subjects with Down Syndrome ». *Neuroscience Letters* 413 (1): 77-81. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2006.11.026>.

Drummond, Eleanor, et Thomas Wisniewski. 2017. « Alzheimer's Disease: Experimental Models and Reality ». *Acta Neuropathologica* 133 (2): 155-75. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1662-x>.

Duchon, Arnaud, Maria Del Mar Muniz Moreno, Sandra Martin Lorenzo, Marcia Priscilla Silva de Souza, Claire Chevalier, Valérie Nalesso, Hamid Meziane, et al. 2021. « Multi-Influential Genetic Interactions Alter Behaviour and Cognition through Six Main Biological Cascades in Down Syndrome Mouse Models ». *Human Molecular Genetics* 30 (9): 771-88. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddab012>.

Duchon, Arnaud, Marta Fructuoso-Castellar, Mary Mondino, Chrystelle Po, Vincent Noblet, Marie Christine Birling, Marie-Claude Potier, et Yann Herault. s. d. « 1 Ts66Yah, a Refined Ts65Dn DS Mouse Model, Unravels Genetic 2 Interaction between Regions Homologous to Human Chromosome 21 3 and the Scaf8-Pde10a Genetic Interval. », 58.

Duchon, Arnaud, et Yann Herault. 2016. « DYRK1A, a Dosage-Sensitive Gene Involved in Neurodevelopmental Disorders, Is a Target for Drug Development in Down Syndrome ». *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 10 (juin). <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2016.00104>.

Duchon, Arnaud, Matthieu Raveau, Claire Chevalier, Valérie Nalesso, Andrew J. Sharp, et Yann Herault. 2011. « Identification of the Translocation Breakpoints in the Ts65Dn and Ts1Cje Mouse Lines: Relevance for Modeling down Syndrome ». *Mammalian Genome* 22 (11-12): 674-84. <https://doi.org/10.1007/s00335-011-9356-0>.

Earl, Rachel K., Tychele N. Turner, Heather C. Mefford, Caitlin M. Hudac, Jennifer Gerds, Evan E. Eichler, et Raphael A. Bernier. 2017. « Clinical Phenotype of ASD-Associated DYRK1A Haploinsufficiency ». *Molecular Autism* 8 (1): 54. <https://doi.org/10.1186/s13229-017-0173-5>.

Ellenbroek, Bart, et Jiun Youn. 2016. « Rodent Models in Neuroscience Research: Is It a Rat Race? » *Disease Models & Mechanisms* 9 (10): 1079-87. <https://doi.org/10.1242/dmm.026120>.

Ennaceur, A., et J. Delacour. 1988. « A New One-Trial Test for Neurobiological Studies of Memory in Rats. 1: Behavioral Data ». *Behavioural Brain Research* 31 (1): 47-59. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(88\)90157-X](https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90157-X).

Ennaceur, A., Nick Neave, et John P. Aggleton. 1997. « Spontaneous Object Recognition and Object Location Memory in Rats: The Effects of Lesions in the Cingulate Cortices, the Medial Prefrontal Cortex, the Cingulum Bundle and the Fornix ». *Experimental Brain Research* 113 (3): 509-19. <https://doi.org/10.1007/PL00005603>.

Fabia, J., et M. Drolette. 1970. « Malformations and Leukemia in Children with Down's Syndrome ». *Pediatrics* 45 (1): 60-70.

Farahani, Farzad V., Magdalena Fafrowicz, Waldemar Karwowski, Pamela K. Douglas, Aleksandra Domagalik, Ewa Beldzik, Halszka Oginska, et Tadeusz Marek. 2019. « Effects of Chronic Sleep Restriction on the Brain Functional Network, as Revealed by Graph Theory ». *Frontiers in Neuroscience* 13 (octobre): 1087. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01087>.

Faulks, D., V. Collado, M.-N. Mazille, J.-L. Veyrone, et M. Hennequin. 2008. « Masticatory Dysfunction in Persons with Down's Syndrome. Part 1: Aetiology and Incidence ». *Journal of Oral Rehabilitation* 35 (11): 854-62. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2008.01877.x>.

Fontana, Martina, Maria Carmen Usai, Sandra Pellizzoni, et Maria Chiara Passolunghi. 2021. « Inhibitory Dimensions and Delay of Gratification: A Comparative Study on Individuals with Down Syndrome and Typically Developing Children ». *Brain Sciences* 11 (5): 636. <https://doi.org/10.3390/brainsci11050636>.

Fotaki, V., M. Martínez de Lagrán, X. Estivill, M. Arbonés, et M. Dierssen. 2004. « Haploinsufficiency of Dyrk1A in Mice Leads to Specific Alterations in the Development and Regulation of Motor Activity. » *Behavioral Neuroscience* 118 (4): 815-21. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.118.4.815>.

Fotaki, Vassiliki, Mara Dierssen, Soledad Alcántara, Salvador Martínez, Eulàlia Martí, Caty Casas, Joana Visa, Eduardo Soriano, Xavier Estivill, et Maria L. Arbonés. 2002. « Dyrk1A Haploinsufficiency Affects Viability and Causes Developmental Delay and Abnormal Brain Morphology in Mice ». *Molecular and Cellular Biology* 22 (18): 6636-47. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.18.6636-6647.2002>.

- Frid, C., P. Drott, B. Lundell, F. Rasmussen, et G. Annerén. 1999. « Mortality in Down's Syndrome in Relation to Congenital Malformations ». *Journal of Intellectual Disability Research* 43 (3): 234-41. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2788.1999.00198.x>.
- Frith, Uta, et Christopher D. Frith. 1974. « SPECIFIC MOTOR DISABILITIES IN DOWNS SYNDROME ». *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 15 (4): 293-301. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7610.1974.tb01253.x>.
- García-Cerro, Susana, Paula Martínez, Verónica Vidal, Andrea Corrales, Jesús Flórez, Rebeca Vidal, Noemí Rueda, María L. Arbonés, et Carmen Martínez-Cué. 2014. « Overexpression of Dyrk1A Is Implicated in Several Cognitive, Electrophysiological and Neuromorphological Alterations Found in a Mouse Model of Down Syndrome ». Édité par Paul A. Adlard. *PLoS ONE* 9 (9): e106572. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106572>.
- Goodliffe, J. W., J. L. Olmos-Serrano, N. M. Aziz, J. L. A. Pennings, F. Guedj, D. W. Bianchi, et T. F. Haydar. 2016. « Absence of Prenatal Forebrain Defects in the Dp(16)1Yey/+ Mouse Model of Down Syndrome ». *Journal of Neuroscience* 36 (10): 2926-44. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2513-15.2016>.
- Graaf, Gert de, Frank Buckley, et Brian G. Skotko. 2017. « Estimation of the Number of People with Down Syndrome in the United States ». *Genetics in Medicine* 19 (4): 439-47. <https://doi.org/10.1038/gim.2016.127>.
- Grandjean, Joanes, Carola Canella, Cynthia Anckaerts, Gülebru Ayrancı, Salma Bougacha, Thomas Bienert, David Buehlmann, et al. 2020. « Common Functional Networks in the Mouse Brain Revealed by Multi-Centre Resting-State fMRI Analysis ». *NeuroImage* 205 (janvier): 116278. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.116278>.
- Grau, Cristina, Krisztina Arat³, Jos[©] M. Fern^ñndez-Fern^ñndez, Aitana Valderrama, Carlos Sindreu, Cristina Fillat, Isidre Ferrer, Susana de la Luna, et Xavier Altafaj. 2014. « DYRK1A-mediated phosphorylation of GluN2A at Ser1048 regulates the surface expression and channel activity of GluN1/GluN2A receptors ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8 (octobre). <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00331>.
- Gribble, Susan M., Frances K. Wiseman, Stephen Clayton, Elena Prigmore, Elizabeth Langley, Fengtang Yang, Sean Maguire, et al. 2013. « Massively Parallel Sequencing Reveals the Complex Structure of an Irradiated Human Chromosome on a Mouse Background in the Tc1 Model of Down Syndrome ». Édité par Tim Thomas. *PLoS ONE* 8 (4): e60482. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060482>.
- Gruhn, Jennifer R., Agata P. Zielinska, Vallari Shukla, Robert Blanshard, Antonio Capalbo, Danilo Cimadomo, Dmitry Nikiforov, et al. 2019. « Chromosome Errors in Human Eggs Shape Natural Fertility over Reproductive Life Span ». *Science* 365 (6460): 1466-69. <https://doi.org/10.1126/science.aav7321>.
- Guedj, Fayçal, Patricia Lopes Pereira, Sonia Najas, Maria-Jose Barallobre, Caroline Chabert, Benoit Souchet, Catherine Sebrie, et al. 2012. « DYRK1A: A Master Regulatory Protein Controlling Brain Growth ». *Neurobiology of Disease* 46 (1): 190-203. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.01.007>.
- Guidi, Sandra, Paola Bonasoni, Claudio Ceccarelli, Donatella Santini, Fabio Gualtieri, Elisabetta Ciani, et Renata Bartesaghi. 2008. « Neurogenesis Impairment and Increased Cell Death Reduce Total

- Neuron Number in the Hippocampal Region of Fetuses with Down Syndrome ». *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 18 (2): 180-97. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00113.x>.
- Gunbey, H. P., E. Gunbey, K. Aslan, T. Bulut, A. Unal, et L. Incesu. 2017. « Limbic-Auditory Interactions of Tinnitus: An Evaluation Using Diffusion Tensor Imaging ». *Clinical Neuroradiology* 27 (2): 221-30. <https://doi.org/10.1007/s00062-015-0473-0>.
- Gupta, Meenal, A. Ranjitha Dhanasekaran, et Kathleen J. Gardiner. 2016. « Mouse Models of Down Syndrome: Gene Content and Consequences ». *Mammalian Genome* 27 (11-12): 538-55. <https://doi.org/10.1007/s00335-016-9661-8>.
- Haass, C., C. Kaether, G. Thinakaran, et S. Sisodia. 2012. « Trafficking and Proteolytic Processing of APP ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (5): a006270-a006270. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006270>.
- Haettig, Jakob, Daniel P. Stefanko, Monica L. Multani, Dario X. Figueroa, Susan C. McQuown, et Marcelo A. Wood. 2011. « HDAC Inhibition Modulates Hippocampus-Dependent Long-Term Memory for Object Location in a CBP-Dependent Manner ». *Learning & Memory* 18 (2): 71-79. <https://doi.org/10.1101/lm.1986911>.
- Hall, Jessica H., Frances K. Wiseman, Elizabeth M.C. Fisher, Victor L.J. Tybulewicz, John L. Harwood, et Mark A. Good. 2016. « Tc1 Mouse Model of Trisomy-21 Dissociates Properties of Short- and Long-Term Recognition Memory ». *Neurobiology of Learning and Memory* 130 (avril): 118-28. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.02.002>.
- Hamada, Toshihiko, Fumitake Gejyo, Yoshifumi Koshino, Tetsuhito Murata, Masao Omori, Masashi Nishio, Toshihiro Misawa, et Kiminori Isaki. 1998. « Echocardiographic Evaluation of Cardiac Valvular Abnormalities in Adults with Down's Syndrome. ». *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 185 (1): 31-35. <https://doi.org/10.1620/tjem.185.31>.
- Hämmerle, Barbara, Edgar Ulin, Jordi Guimera, Walter Becker, François Guillemot, et Francisco J. Tejedor. 2011. « Transient Expression of *Mnb/Dyrk1a* Couples Cell Cycle Exit and Differentiation of Neuronal Precursors by Inducing *P27KIP1* Expression and Suppressing NOTCH Signaling ». *Development* 138 (12): 2543-54. <https://doi.org/10.1242/dev.066167>.
- Hamner, Taralee, Manisha D. Udhnani, Karol Z. Osipowicz, et Nancy Raitano Lee. 2018. « Pediatric Brain Development in Down Syndrome: A Field in Its Infancy ». *Journal of the International Neuropsychological Society* 24 (9): 966-76. <https://doi.org/10.1017/S1355617718000206>.
- Handen, Benjamin, Isabel Clare, Charles Laymon, Melissa Petersen, Shahid Zaman, Sid O'Bryant, Davneet Minhas, Dana Tudorascu, Stephanie Brown, et Bradley Christian. 2021. « Acute Regression in Down Syndrome ». *Brain Sciences* 11 (8): 1109. <https://doi.org/10.3390/brainsci11081109>.
- Hasle, Henrik, Jan M. Friedman, Jørgen H. Olsen, et Sonja A. Rasmussen. 2016. « Low Risk of Solid Tumors in Persons with Down Syndrome ». *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 18 (11): 1151-57. <https://doi.org/10.1038/gim.2016.23>.
- Hattori, M., A. Fujiyama, T. D. Taylor, H. Watanabe, T. Yada, H. S. Park, A. Toyoda, et al. 2000. « The DNA Sequence of Human Chromosome 21 ». *Nature* 405 (6784): 311-19. <https://doi.org/10.1038/35012518>.
- Heinke, Dominique, Jennifer L. Isenburg, Erin B. Stallings, Tyiesha D. Short, Mimi Le, Sarah Fisher, Xiaoyi Shan, et al. 2021. « Prevalence of Structural Birth Defects among Infants with Down Syndrome,

- 2013–2017: A US Population-based Study ». *Birth Defects Research* 113 (2): 189-202. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1854>.
- Herault, Yann, Jean M. Delabar, Elizabeth M. C. Fisher, Victor L. J. Tybulewicz, Eugene Yu, et Veronique Brault. 2017. « Rodent Models in Down Syndrome Research: Impact and Future Opportunities ». *Disease Models & Mechanisms* 10 (10): 1165-86. <https://doi.org/10.1242/dmm.029728>.
- Himpel, Sunke, Pascal Panzer, Klaus Eirmbter, Hanna Czajkowska, Muhammed Sayed, Len C. Packman, Tom Blundell, et al. 2001. « Identification of the Autophosphorylation Sites and Characterization of Their Effects in the Protein Kinase DYRK1A ». *Biochemical Journal* 359 (3): 497-505. <https://doi.org/10.1042/bj3590497>.
- Hjelmervik, Helene, Markus Hausmann, Berge Osnes, René Westerhausen, et Karsten Specht. 2014. « Resting States Are Resting Traits – An fMRI Study of Sex Differences and Menstrual Cycle Effects in Resting State Cognitive Control Networks ». Édité par Daniele Marinazzo. *PLoS ONE* 9 (7): e103492. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103492>.
- Hofer, Sonja B., et Tobias Bonhoeffer. 2010. « Dendritic Spines: The Stuff That Memories Are Made Of? » *Current Biology* 20 (4): R157-59. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.12.040>.
- Hoffmire, Claire A., Caroline I. Magyar, Heidi V. Connolly, I. Diana Fernandez, et Edwin van Wijngaarden. 2014. « High Prevalence of Sleep Disorders and Associated Comorbidities in a Community Sample of Children with Down Syndrome ». *Journal of Clinical Sleep Medicine* 10 (04): 411-19. <https://doi.org/10.5664/jcsm.3618>.
- Hollis, NaTasha D., Emily G. Allen, Tiffany Renee Oliver, Stuart W. Tinker, Charlotte Druschel, Charlotte A. Hobbs, Leslie A. O'Leary, et al. 2013. « Preconception Folic Acid Supplementation and Risk for Chromosome 21 Nondisjunction: A Report from the National Down Syndrome Project ». *American Journal of Medical Genetics Part A* 161 (3): 438-44. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35796>.
- Hooli, B. V., G. Mohapatra, M. Mattheisen, A. R. Parrado, J. T. Roehr, Y. Shen, J. F. Gusella, et al. 2012. « Role of Common and Rare APP DNA Sequence Variants in Alzheimer Disease ». *Neurology* 78 (16): 1250-57. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182515972>.
- Horányi, Dániel, Lilla Éva Babay, János Rigó, Balázs Gyórfy, et Gyula R. Nagy. 2017. « Effect of Extended Oral Contraception Use on the Prevalence of Fetal Trisomy 21 in Women Aged at Least 35 Years ». *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 138 (3): 261-66. <https://doi.org/10.1002/ijgo.12238>.
- Hultén, Maj A, Suketu Patel, Jon Jonasson, et Erik Iwarsson. 2010. « On the Origin of the Maternal Age Effect in Trisomy 21 Down Syndrome: The Oocyte Mosaicism Selection Model ». *REPRODUCTION* 139 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0088>.
- Ichijo, Hidenori, Eisuke Nishida, Kenji Irie, Peter ten Dijke, Masao Saitoh, Tetsuo Moriguchi, Minoru Takagi, Kunihiro Matsumoto, Kohei Miyazono, et Yukiko Gotoh. 1997. « Induction of Apoptosis by ASK1, a Mammalian MAPKKK That Activates SAPK/JNK and P38 Signaling Pathways ». *Science* 275 (5296): 90-94. <https://doi.org/10.1126/science.275.5296.90>.
- Iulita, Maria Florencia, Diana Garzón Chavez, Maria Klitgaard Christensen, Natalia Valle Tamayo, Oleguer Plana-Ripoll, Sonja A. Rasmussen, Marta Roqué Figuls, et al. 2022. « Association of Alzheimer Disease With Life Expectancy in People With Down Syndrome ». *JAMA Network Open* 5 (5): e2212910. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2022.12910>.

- Jacola, L. M., A. W. Byars, F. Hickey, J. Vannest, S. K. Holland, et M. B. Schapiro. 2014. « Functional Magnetic Resonance Imaging of Story Listening in Adolescents and Young Adults with Down Syndrome: Evidence for Atypical Neurodevelopment: FMRI Activation in Down Syndrome ». *Journal of Intellectual Disability Research* 58 (10): 892-902. <https://doi.org/10.1111/jir.12089>.
- Ji, Jianling, Hane Lee, Bob Argiropoulos, Naghmeh Dorrani, John Mann, Julian A Martinez-Agosto, Natalia Gomez-Ospina, et al. 2015. « DYRK1A Haploinsufficiency Causes a New Recognizable Syndrome with Microcephaly, Intellectual Disability, Speech Impairment, and Distinct Facies ». *European Journal of Human Genetics* 23 (11): 1473-81. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.71>.
- Jinek, Martin, Fuguo Jiang, David W. Taylor, Samuel H. Sternberg, Emine Kaya, Enbo Ma, Carolin Anders, et al. 2014. « Structures of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation ». *Science* 343 (6176): 1247997. <https://doi.org/10.1126/science.1247997>.
- Kazuki, Yasuhiro, Feng J. Gao, Miho Yamakawa, Masumi Hirabayashi, Kanako Kazuki, Naoyo Kajitani, Sachiko Miyagawa-Tomita, et al. 2022. « A Transchromosomal Rat Model with Human Chromosome 21 Shows Robust Down Syndrome Features ». *The American Journal of Human Genetics* 109 (2): 328-44. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.12.015>.
- Kazuki, Yasuhiro, Kaoru Kobayashi, Masumi Hirabayashi, Satoshi Abe, Naoyo Kajitani, Kanako Kazuki, Shoko Takehara, et al. 2019. « Humanized UGT2 and CYP3A Transchromosomal Rats for Improved Prediction of Human Drug Metabolism ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (8): 3072-81. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808255116>.
- Kelly, Paul A., et Zohra Rahmani. 2005. « DYRK1A Enhances the Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade in PC12 Cells by Forming a Complex with Ras, B-Raf, and MEK1 ». *Molecular Biology of the Cell* 16 (8): 3562-73. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-12-1085>.
- Khoshnood, Babak, Ruth Greenlees, Maria Loane, Helen Dolk, et on behalf of the EUROCAT Project Management Committee and a EUROCAT Working Group. 2011. « Paper 2: EUROCAT Public Health Indicators for Congenital Anomalies in Europe ». *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 91 (S1): S16-22. <https://doi.org/10.1002/bdra.20776>.
- Kinstrie, Ross, Nathan Luebbering, Diego Miranda-Saavedra, Gary Sibbet, Jingfen Han, Pamela A. Lochhead, et Vaughn Cleghon. 2010. « Characterization of a Domain That Transiently Converts Class 2 DYRKs into Intramolecular Tyrosine Kinases ». *Science Signaling* 3 (111). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000579>.
- Kittler, P., S. J. Krinsky-McHale, et D. A. Devenny. 2006. « Verbal Intrusions Precede Memory Decline in Adults with Down Syndrome ». *Journal of Intellectual Disability Research* 50 (1): 1-10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2788.2005.00715.x>.
- Korbel, J. O., T. Tirosh-Wagner, A. E. Urban, X.-N. Chen, M. Kasowski, L. Dai, F. Grubert, et al. 2009. « The Genetic Architecture of Down Syndrome Phenotypes Revealed by High-Resolution Analysis of Human Segmental Trisomies ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (29): 12031-36. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813248106>.
- Korenberg, J. R., X. N. Chen, R. Schipper, Z. Sun, R. Gonsky, S. Gerwehr, N. Carpenter, C. Daumer, P. Dignan, et C. Disteche. 1994. « Down Syndrome Phenotypes: The Consequences of Chromosomal Imbalance. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (11): 4997-5001. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.11.4997>.

- Kraeuter, Ann-Katrin, Paul C. Guest, et Zoltán Sarnyai. 2019. « The Y-Maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice ». In *Pre-Clinical Models*, édité par Paul C. Guest, 1916:105-11. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8994-2_10.
- Lagan, Niamh, Dean Huggard, Fiona Mc Grane, Timothy Ronan Leahy, Orla Franklin, Edna Roche, David Webb, et al. 2020. « Multiorgan Involvement and Management in Children with Down Syndrome ». *Acta Paediatrica* 109 (6): 1096-1111. <https://doi.org/10.1111/apa.15153>.
- Laguna, Ariadna, Sergi Aranda, María José Barallobre, Rima Barhoum, Eduardo Fernández, Vassiliki Fotaki, Jean Maurice Delabar, Susana de la Luna, Pedro de la Villa, et Maria L. Arbonés. 2008. « The Protein Kinase DYRK1A Regulates Caspase-9-Mediated Apoptosis during Retina Development ». *Developmental Cell* 15 (6): 841-53. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.10.014>.
- Laguna, Ariadna, María-José Barallobre, Miguel-Ángel Marchena, Catarina Mateus, Erika Ramírez, Carmen Martínez-Cue, Jean M. Delabar, Miguel Castelo-Branco, Pedro de la Villa, et Maria L. Arbonés. 2013. « Triplication of DYRK1A Causes Retinal Structural and Functional Alterations in Down Syndrome ». *Human Molecular Genetics* 22 (14): 2775-84. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt125>.
- Laham, Amina Jamal, Maha Saber-Ayad, et Raafat El-Awady. 2021. « DYRK1A: A down Syndrome-Related Dual Protein Kinase with a Versatile Role in Tumorigenesis ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 78 (2): 603-19. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03626-4>.
- Lanfranchi, S., O. Jerman, E. Dal Pont, A. Alberti, et R. Vianello. 2010. « Executive Function in Adolescents with Down Syndrome: Executive Function in Down Syndrome ». *Journal of Intellectual Disability Research* 54 (4): 308-19. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2788.2010.01262.x>.
- Lanfranchi, Silvia, Olga Jerman, et Renzo Vianello. 2009. « Working Memory and Cognitive Skills in Individuals with Down Syndrome ». *Child Neuropsychology* 15 (4): 397-416. <https://doi.org/10.1080/09297040902740652>.
- Lanzillotta, Chiara, et Fabio Di Domenico. 2021. « Stress Responses in Down Syndrome Neurodegeneration: State of the Art and Therapeutic Molecules ». *Biomolecules* 11 (2): 266. <https://doi.org/10.3390/biom11020266>.
- Larsen, Karen Bonde, Henning Laursen, Niels Græm, Grethe Badsberg Samuelsen, Nenad Bogdanovic, et Bente Pakkenberg. 2008. « Reduced Cell Number in the Neocortical Part of the Human Fetal Brain in Down Syndrome ». *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 190 (5): 421-27. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2008.05.007>.
- Lee, Chia-Fan, Chia-Hsuan Lee, Wan-Yi Hsueh, Ming-Tzer Lin, et Kun-Tai Kang. 2018. « Prevalence of Obstructive Sleep Apnea in Children With Down Syndrome: A Meta-Analysis ». *Journal of Clinical Sleep Medicine* 14 (05): 867-75. <https://doi.org/10.5664/jcsm.7126>.
- Lee, Sang Bae, Aram Ko, Young Taek Oh, Peiguo Shi, Fulvio D'Angelo, Brulinda Frangaj, Antonius Koller, et al. 2020. « Proline Hydroxylation Primes Protein Kinases for Autophosphorylation and Activation ». *Molecular Cell* 79 (3): 376-389.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.06.021>.
- Lejeune, J., R. Turpin, et M. Gautier. 1959. « [Mongolism; a chromosomal disease (trisomy)] ». *Bulletin De l'Academie Nationale De Medecine* 143 (11-12): 256-65.
- Li, Zhongyou, Tao Yu, Masae Morishima, Annie Pao, Jeffrey LaDuca, Jeffrey Conroy, Norma Nowak, Sei-Ichi Matsui, Isao Shiraishi, et Y. Eugene Yu. 2007. « Duplication of the Entire 22.9 Mb Human

Chromosome 21 Syntenic Region on Mouse Chromosome 16 Causes Cardiovascular and Gastrointestinal Abnormalities ». *Human Molecular Genetics* 16 (11): 1359-66. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm086>.

Lindberg, Mattias F., et Laurent Meijer. 2021. « Dual-Specificity, Tyrosine Phosphorylation-Regulated Kinases (DYRKs) and Cdc2-Like Kinases (CLKs) in Human Disease, an Overview ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (11): 6047. <https://doi.org/10.3390/ijms22116047>.

Lindner, Loic, Pauline Cayrou, Sylvie Jacquot, Marie-Christine Birling, Yann Herault, et Guillaume Pavlovic. 2021. « Reliable and Robust Droplet Digital PCR (DdPCR) and RT-DdPCR Protocols for Mouse Studies ». *Methods* 191 (juillet): 95-106. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.07.004>.

Liu, Fei, Zhihou Liang, Jerzy Wegiel, Yu-Wen Hwang, Khalid Iqbal, Inge Grundke-Iqbal, Narayan Ramakrishna, et Cheng-Xin Gong. 2008. « Overexpression of Dyrk1A Contributes to Neurofibrillary Degeneration in Down Syndrome ». *The FASEB Journal* 22 (9): 3224-33. <https://doi.org/10.1096/fj.07-104539>.

Logue, S.F., E.H. Owen, D.L. Rasmussen, et J.M. Wehner. 1997. « Assessment of Locomotor Activity, Acoustic and Tactile Startle, and Prepulse Inhibition of Startle in Inbred Mouse Strains and F1 Hybrids: Implications of Genetic Background for Single Gene and Quantitative Trait Loci Analyses ». *Neuroscience* 80 (4): 1075-86. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00164-4](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00164-4).

Luco, Stephanie M., Daniela Pohl, Erick Sell, Justin D. Wagner, David A. Dymont, et Hussein Daoud. 2016. « Case Report of Novel DYRK1A Mutations in 2 Individuals with Syndromic Intellectual Disability and a Review of the Literature ». *BMC Medical Genetics* 17 (1): 15. <https://doi.org/10.1186/s12881-016-0276-4>.

Luo, Weijun, Michael S. Friedman, Kerby Shedden, Kurt D. Hankenson, et Peter J. Woolf. 2009. « GAGE: Generally Applicable Gene Set Enrichment for Pathway Analysis ». *BMC Bioinformatics* 10 (mai): 161. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-161>.

Lyle, Robert, Frédérique Béna, Sarantis Gagos, Corinne Gehrig, Gipsy Lopez, Albert Schinzel, James Lespinasse, et al. 2009. « Genotype–Phenotype Correlations in Down Syndrome Identified by Array CGH in 30 Cases of Partial Trisomy and Partial Monosomy Chromosome 21 ». *European Journal of Human Genetics* 17 (4): 454-66. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.214>.

Marin-Padilla, Miguel. 1976. « Pyramidal Cell Abnormalities in the Motor Cortex of a Child with Down's Syndrome. A Golgi Study ». *The Journal of Comparative Neurology* 167 (1): 63-81. <https://doi.org/10.1002/cne.901670105>.

Martinez de Lagran, M., R. Benavides-Piccione, I. Ballesteros-Yanez, M. Calvo, M. Morales, C. Fillat, J. DeFelipe, G. J. A. Ramakers, et M. Dierssen. 2012. « Dyrk1A Influences Neuronal Morphogenesis Through Regulation of Cytoskeletal Dynamics in Mammalian Cortical Neurons ». *Cerebral Cortex* 22 (12): 2867-77. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhr362>.

Martínez-Frías, M. L., E. Bermejo, E. Rodríguez-Pinilla, et J. L. Frías. 2001. « Exstrophy of the Cloaca and Exstrophy of the Bladder: Two Different Expressions of a Primary Developmental Field Defect ». *American Journal of Medical Genetics* 99 (4): 261-69. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1210>.

Martí, Eulàlia, Xavier Altafaj, Mara Dierssen, Susana de la Luna, Vassiliki Fotaki, Mónica Alvarez, Mercè Pérez-Riba, Isidro Ferrer, et Xavier Estivill. 2003. « Dyrk1A Expression Pattern Supports Specific Roles of This Kinase in the Adult Central Nervous System ». *Brain Research* 964 (2): 250-63. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)04069-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)04069-6).

- Martínez de Lagrán, M, X Altafaj, X Gallego, E Martí, X Estivill, I Sahún, C Fillat, et M Dierssen. 2004. « Motor Phenotypic Alterations in TgDyrk1a Transgenic Mice Implicate DYRK1A in Down Syndrome Motor Dysfunction ». *Neurobiology of Disease* 15 (1): 132-42. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.10.002>.
- McBeath, Rowena, Dana M Pirone, Celeste M Nelson, Kiran Bhadriraju, et Christopher S Chen. 2004. « Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment ». *Developmental Cell* 6 (4): 483-95. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(04\)00075-9](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(04)00075-9).
- McCarron, M., P. McCallion, E. Reilly, P. Dunne, R. Carroll, et N. Mulryan. 2017. « A Prospective 20-Year Longitudinal Follow-up of Dementia in Persons with Down Syndrome ». *Journal of Intellectual Disability Research: JIDR* 61 (9): 843-52. <https://doi.org/10.1111/jir.12390>.
- McCoy, Rajiv C., Zachary P. Demko, Allison Ryan, Milena Banjevic, Matthew Hill, Styrmir Sigurjonsson, Matthew Rabinowitz, et Dmitri A. Petrov. 2015. « Evidence of Selection against Complex Mitotic-Origin Aneuploidy during Preimplantation Development ». Édité par Norman Arnheim. *PLOS Genetics* 11 (10): e1005601. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005601>.
- McElyea, Samantha D., John M. Starbuck, Danika M. Tumbleson-Brink, Emily Harrington, Joshua D. Blazek, Ahmed Ghoneima, Katherine Kula, et Randall J. Roper. 2016. « Influence of Prenatal EGCG Treatment and *Dyrk1a* Dosage Reduction on Craniofacial Features Associated with Down Syndrome ». *Human Molecular Genetics*, septembre, ddw309. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw309>.
- Melyn, M. A., et D. T. White. 1973. « Mental and Developmental Milestones of Noninstitutionalized Down's Syndrome Children ». *Pediatrics* 52 (4): 542-45.
- Mircher, Clotilde, Cécile Cieuta-Walti, Isabelle Marey, Anne-Sophie Rebillat, Laura Cretu, Eliane Milenko, Martine Conte, Franck Sturtz, Marie-Odile Rethore, et Aimé Ravel. 2017. « Acute Regression in Young People with Down Syndrome ». *Brain Sciences* 7 (12): 57. <https://doi.org/10.3390/brainsci7060057>.
- Møller, Rikke S., Sabine Kübart, Maria Hoeltzenbein, Babett Heye, Ida Vogel, Christian P. Hansen, Corinna Menzel, et al. 2008. « Truncation of the Down Syndrome Candidate Gene DYRK1A in Two Unrelated Patients with Microcephaly ». *The American Journal of Human Genetics* 82 (5): 1165-70. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.03.001>.
- Moore, Clara S. 2006. « Postnatal Lethality and Cardiac Anomalies in the Ts65Dn Down Syndrome Mouse Model ». *Mammalian Genome* 17 (10): 1005-12. <https://doi.org/10.1007/s00335-006-0032-8>.
- Morice, Elise, Laura C. Andreae, Sam F. Cooke, Lesley Vanes, Elizabeth M.C. Fisher, Victor L.J. Tybulewicz, et Timothy V.P. Bliss. 2008. « Preservation of Long-Term Memory and Synaptic Plasticity despite Short-Term Impairments in the Tc1 Mouse Model of Down Syndrome ». *Learning & Memory* 15 (7): 492-500. <https://doi.org/10.1101/lm.969608>.
- Morris, Charlotte Rose, Shaun Haigh, Gavin Cuthbert, Moira Crosier, Fiona Harding, et John Wolstenholme. 2012. « Origin of Trisomy: No Evidence to Support the Ovarian Mosaicism Theory ». *Prenatal Diagnosis* 32 (7): 668-73. <https://doi.org/10.1002/pd.3885>.
- Mouse Genome Sequencing Consortium. 2002. « Initial Sequencing and Comparative Analysis of the Mouse Genome ». *Nature* 420 (6915): 520-62. <https://doi.org/10.1038/nature01262>.

Mumby, Dave G, Melissa J Glenn, Catherine Nesbitt, et Diana A Kyriazis. 2002. « Dissociation in Retrograde Memory for Object Discriminations and Object Recognition in Rats with Perirhinal Cortex Damage ». *Behavioural Brain Research* 132 (2): 215-26. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00444-2](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00444-2).

Nagaoka, So I., Terry J. Hassold, et Patricia A. Hunt. 2012. « Human Aneuploidy: Mechanisms and New Insights into an Age-Old Problem ». *Nature Reviews Genetics* 13 (7): 493-504. <https://doi.org/10.1038/nrg3245>.

Nagy, Gyula Richárd, Balázs Győrffy, Bálint Nagy, et János Rigó. 2013. « Lower Risk for Down Syndrome Associated with Longer Oral Contraceptive Use: A Case–Control Study of Women of Advanced Maternal Age Presenting for Prenatal Diagnosis ». *Contraception* 87 (4): 455-58. <https://doi.org/10.1016/j.contraception.2012.08.040>.

Nguyen, Thu Lan, Arnaud Duchon, Antigoni Manousopoulou, Nadège Loaëc, Benoît Villiers, Guillaume Pani, Meltem Karatas, et al. 2018. « Correction of Cognitive Deficits in Mouse Models of Down Syndrome by a Pharmacological Inhibitor of DYRK1A ». *Disease Models & Mechanisms* 11 (9): dmm035634. <https://doi.org/10.1242/dmm.035634>.

Nguyen, Thu Lan, Corinne Fruit, Yann Héroult, Laurent Meijer, et Thierry Besson. 2017. « Dual-Specificity Tyrosine Phosphorylation-Regulated Kinase 1A (DYRK1A) Inhibitors: A Survey of Recent Patent Literature ». *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 27 (11): 1183-99. <https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1360285>.

Nishitoh, Hideki, Atsushi Matsuzawa, Kei Tobiume, Kaoru Saegusa, Kohsuke Takeda, Kiyoshi Inoue, Seiji Hori, Akira Kakizuka, et Hidenori Ichijo. 2002. « ASK1 Is Essential for Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Neuronal Cell Death Triggered by Expanded Polyglutamine Repeats ». *Genes & Development* 16 (11): 1345-55. <https://doi.org/10.1101/gad.992302>.

O'Doherty, Aideen, Sandra Ruf, Claire Mulligan, Victoria Hildreth, Mick L. Errington, Sam Cooke, Abdul Sesay, et al. 2005. « An Aneuploid Mouse Strain Carrying Human Chromosome 21 with Down Syndrome Phenotypes ». *Science* 309 (5743): 2033-37. <https://doi.org/10.1126/science.1114535>.

Okui, Michiyo, Toshinori Ide, Keiichi Morita, Eishi Funakoshi, Fumiaki Ito, Kiyokazu Ogita, Yukio Yoneda, Jun Kudoh, et Nobuyoshi Shimizu. 1999. « High-Level Expression of the Mnb/Dyrk1A Gene in Brain and Heart during Rat Early Development ». *Genomics* 62 (2): 165-71. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.5998>.

Olmos-Serrano, Jose Luis, Hyo Jung Kang, William A. Tyler, John C. Silbereis, Feng Cheng, Ying Zhu, Mihovil Pletikos, et al. 2016. « Down Syndrome Developmental Brain Transcriptome Reveals Defective Oligodendrocyte Differentiation and Myelination ». *Neuron* 89 (6): 1208-22. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.042>.

Olton, David S., Christine Collison, et Mary Ann Werz. 1977. « Spatial Memory and Radial Arm Maze Performance of Rats ». *Learning and Motivation* 8 (3): 289-314. [https://doi.org/10.1016/0023-9690\(77\)90054-6](https://doi.org/10.1016/0023-9690(77)90054-6).

Ori-McKenney, Cassandra M., Richard J. McKenney, Hector H. Huang, Tun Li, Shan Meltzer, Lily Yeh Jan, Ronald D. Vale, Arun P. Wiita, et Yuh Nung Jan. 2016. « Phosphorylation of β -Tubulin by the Down Syndrome Kinase, Minibrain/DYRK1a, Regulates Microtubule Dynamics and Dendrite Morphogenesis ». *Neuron* 90 (3): 551-63. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.027>.

- Ortiz-Abalia, Jon, Ignasi Sahún, Xavier Altafaj, Núria Andreu, Xavier Estivill, Mara Dierssen, et Cristina Fillat. 2008. « Targeting Dyrk1A with AAVshRNA Attenuates Motor Alterations in TgDyrk1A, a Mouse Model of Down Syndrome ». *The American Journal of Human Genetics* 83 (4): 479-88. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.09.010>.
- Parizot, Estelle, Rodolphe Dard, Nathalie Janel, et François Vialard. 2019. « Down Syndrome and Infertility: What Support Should We Provide? » *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 36 (6): 1063-67. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01457-2>.
- Park, Joongkyu, Jee Young Sung, Joohyun Park, Woo-Joo Song, Sunghoe Chang, et Kwang Chul Chung. 2012. « Dyrk1A Negatively Regulates the Actin Cytoskeleton through Threonine Phosphorylation of N-WASP ». *Journal of Cell Science* 125 (1): 67-80. <https://doi.org/10.1242/jcs.086124>.
- Patkee, Prachi A., Ana A. Baburamani, Vanessa Kyriakopoulou, Alice Davidson, Elhaam Avini, Ralica Dimitrova, Joanna Allsop, et al. 2020. « Early Alterations in Cortical and Cerebellar Regional Brain Growth in Down Syndrome: An in Vivo Fetal and Neonatal MRI Assessment ». *NeuroImage: Clinical* 25: 102139. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2019.102139>.
- Paudel, Nabin, Susan J Leat, Prakash Adhikari, J Margaret Woodhouse, et Jyoti Baba Shrestha. 2010. « Visual Defects in Nepalese Children with Down Syndrome ». *Clinical and Experimental Optometry* 93 (2): 83-90. <https://doi.org/10.1111/j.1444-0938.2010.00458.x>.
- Pavarino Bertelli, Érika Cristina, Joice Matos Biselli, Daiana Bonfim, et Eny Maria Goloni-Bertollo. 2009. « Clinical Profile of Children with down Syndrome Treated in a Genetics Outpatient Service in the Southeast of Brazil ». *Revista Da Associação Médica Brasileira* 55 (5): 547-52. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302009000500017>.
- Pelleri, Maria Chiara, Elena Cicchini, Chiara Locatelli, Lorenza Vitale, Maria Caracausi, Allison Piovesan, Alessandro Rocca, et al. 2016. « Systematic Reanalysis of Partial Trisomy 21 Cases with or without Down Syndrome Suggests a Small Region on 21q22.13 as Critical to the Phenotype ». *Human Molecular Genetics*, avril, ddw116. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw116>.
- Pelleri, Maria Chiara, Elena Cicchini, Michael B. Petersen, Lisbeth Tranebjærg, Teresa Mattina, Pamela Magini, Francesca Antonaros, et al. 2019. « Partial Trisomy 21 Map: Ten Cases Further Supporting the Highly Restricted Down Syndrome Critical Region (HR-DSCR) on Human Chromosome 21 ». *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 7 (8). <https://doi.org/10.1002/mgg3.797>.
- Pelleri, Maria Chiara, Elena Gennari, Chiara Locatelli, Allison Piovesan, Maria Caracausi, Francesca Antonaros, Alessandro Rocca, et al. 2017. « Genotype-Phenotype Correlation for Congenital Heart Disease in Down Syndrome through Analysis of Partial Trisomy 21 Cases ». *Genomics* 109 (5-6): 391-400. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2017.06.004>.
- Petersen, M.B., et M. Mikkelsen. 2000. « Nondisjunction in Trisomy 21: Origin and Mechanisms ». *Cytogenetic and Genome Research* 91 (1-4): 199-203. <https://doi.org/10.1159/000056844>.
- Pinter, Joseph D., Stephan Eliez, J. Eric Schmitt, George T. Capone, et Allan L. Reiss. 2001. « Neuroanatomy of Down's Syndrome: A High-Resolution MRI Study ». *American Journal of Psychiatry* 158 (10): 1659-65. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.158.10.1659>.
- Plaiasu, Vasilica. 2017. « Down Syndrome - Genetics and Cardiogenetics ». *Maedica* 12 (3): 208-13.

- Pons-Espinal, Meritxell, Maria Martinez de Lagran, et Mara Dierssen. 2013. « Environmental Enrichment Rescues DYRK1A Activity and Hippocampal Adult Neurogenesis in TgDyrk1A ». *Neurobiology of Disease* 60 (décembre): 18-31. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.08.008>.
- Powell, Nick M., Marc Modat, M. Jorge Cardoso, Da Ma, Holly E. Holmes, Yichao Yu, James O'Callaghan, et al. 2016. « Fully-Automated MMRI Morphometric Phenotyping of the Tc1 Mouse Model of Down Syndrome ». Édité par Yann Hérault. *PLOS ONE* 11 (9): e0162974. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162974>.
- Pulsifer, Margaret B. 1996. « The Neuropsychology of Mental Retardation ». *Journal of the International Neuropsychological Society* 2 (2): 159-76. <https://doi.org/10.1017/S1355617700001016>.
- Rabilloud, T., L. Vuillard, C. Gilly, et J. J. Lawrence. 1994. « Silver-Staining of Proteins in Polyacrylamide Gels: A General Overview ». *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)* 40 (1): 57-75.
- Ramakers, Ger J.A. 2002. « Rho Proteins, Mental Retardation and the Cellular Basis of Cognition ». *Trends in Neurosciences* 25 (4): 191-99. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)02118-4](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)02118-4).
- Raveau, Matthieu, Atsushi Shimohata, Kenji Amano, Hiroyuki Miyamoto, et Kazuhiro Yamakawa. 2018. « DYRK1A-Haploinsufficiency in Mice Causes Autistic-like Features and Febrile Seizures ». *Neurobiology of Disease* 110 (février): 180-91. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.12.003>.
- Rechsteiner, M., et S. W. Rogers. 1996. « PEST Sequences and Regulation by Proteolysis ». *Trends in Biochemical Sciences* 21 (7): 267-71.
- Redhead, Yushi, Dorota Gibbins, Eva Lana-Elola, Sheona Watson-Scales, Lisa Dobson, Matthias Krause, Karen J. Liu, Elizabeth M. C. Fisher, Jeremy B.A. Green, et Victor L.J. Tybulewicz. 2022. « Craniofacial Dymorphology in Down Syndrome Is Caused by Increased Dosage of Dyrk1a and at Least Three Other Genes ». Preprint. *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1101/2022.06.27.497841>.
- Reeves, Roger H., Nicholas G. Irving, Timothy H. Moran, Anny Wohn, Cheryl Kitt, Sangram S. Sisodia, Cecilia Schmidt, Roderick T. Bronson, et Muriel T. Davisson. 1995. « A Mouse Model for Down Syndrome Exhibits Learning and Behaviour Deficits ». *Nature Genetics* 11 (2): 177-84. <https://doi.org/10.1038/ng1095-177>.
- Reinholdt, Laura G., Yueming Ding, Griffith T. Gilbert, Anne Czechanski, Jeffrey P. Solzak, Randall J. Roper, Mark T. Johnson, Leah Rae Donahue, Cathleen Lutz, et Muriel T. Davisson. 2011. « Molecular Characterization of the Translocation Breakpoints in the Down Syndrome Mouse Model Ts65Dn ». *Mammalian Genome* 22 (11-12): 685-91. <https://doi.org/10.1007/s00335-011-9357-z>.
- Rodrigues, Marta, Joana Nunes, Sofia Figueiredo, António Martins de Campos, et Ana Filipa Geraldo. 2019. « Neuroimaging Assessment in Down Syndrome: A Pictorial Review ». *Insights into Imaging* 10 (1): 52. <https://doi.org/10.1186/s13244-019-0729-3>.
- Roskoski, Robert. 2012. « ERK1/2 MAP Kinases: Structure, Function, and Regulation ». *Pharmacological Research* 66 (2): 105-43. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005>.
- Rovelet-Lecrux, Anne, Didier Hannequin, Gregory Raux, Nathalie Le Meur, Annie Laquerrière, Anne Vital, Cécile Dumanchin, et al. 2006. « APP Locus Duplication Causes Autosomal Dominant Early-

- Onset Alzheimer Disease with Cerebral Amyloid Angiopathy ». *Nature Genetics* 38 (1): 24-26. <https://doi.org/10.1038/ng1718>.
- Rowe, John, Anthony Lavender, et Vicky Turk. 2006. « Cognitive Executive Function in Down's Syndrome ». *British Journal of Clinical Psychology* 45 (1): 5-17. <https://doi.org/10.1348/014466505X29594>.
- Ruediger, Tina, et Juergen Bolz. 2007. « Neurotransmitters and the Development of Neuronal Circuits ». In *Axon Growth and Guidance*, édité par Dominique Bagnard, 621:104-14. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-76715-4_8.
- Ryoo, Soo-Ryoon, Hyun-Jeong Cho, Hye-Won Lee, Hey Kyeong Jeong, Chinzorig Radnaabazar, Yeun-Soo Kim, Min-Jeong Kim, et al. 2008. « Dual-Specificity Tyrosine(Y)-Phosphorylation Regulated Kinase 1A-Mediated Phosphorylation of Amyloid Precursor Protein: Evidence for a Functional Link between Down Syndrome and Alzheimer's Disease ». *Journal of Neurochemistry* 104 (5): 1333-44. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05075.x>.
- Ryoo, Soo-Ryoon, Hey Kyeong Jeong, Chinzorig Radnaabazar, Jin-Ju Yoo, Hyun-Jeong Cho, Hye-Won Lee, In-Sook Kim, et al. 2007. « DYRK1A-Mediated Hyperphosphorylation of Tau ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (48): 34850-57. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707358200>.
- Salichs, Eulàlia, Alice Ledda, Loris Mularoni, M. Mar Albà, et Susana de la Luna. 2009. « Genome-Wide Analysis of Histidine Repeats Reveals Their Role in the Localization of Human Proteins to the Nuclear Speckles Compartment ». Édité par Nicholas Katsanis. *PLoS Genetics* 5 (3): e1000397. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000397>.
- Santos, Fernando Cesar Gimenes Barbosa, Ulisses Alexandre Croti, Carlos Henrique De Marchi, Alexandre Noboru Murakami, Juliana Dane Pereira Brachine, Bruna Cury Borim, Renata Geron Finoti, et Moacir Fernandes de Godoy. 2019. « Surgical Treatment for Congenital Heart Defects in Down Syndrome Patients ». *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery* 34 (1). <https://doi.org/10.21470/1678-9741-2018-0358>.
- Savva, George M., Joan K. Morris, David E. Mutton, et Eva Alberman. 2006. « Maternal Age-Specific Fetal Loss Rates in Down Syndrome Pregnancies ». *Prenatal Diagnosis* 26 (6): 499-504. <https://doi.org/10.1002/pd.1443>.
- Schmahmann, Jeremy D., et Janet C. Sherman. 1997. « Cerebellar Cognitive Affective Syndrome ». In *International Review of Neurobiology*, 41:433-40. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(08\)60363-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(08)60363-3).
- Seifert, Anne, Lindsey A. Allan, et Paul R. Clarke. 2008. « DYRK1A Phosphorylates Caspase 9 at an Inhibitory Site and Is Potently Inhibited in Human Cells by Harmine: Phosphorylation of Caspase 9 by DYRK1A ». *FEBS Journal* 275 (24): 6268-80. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06751.x>.
- Shukla, Deepika, Deepika Bablani, Aman Chowdhry, Raveena Thapar, Puneet Gupta, et Shashwat Mishra. 2014. « Dentofacial and Cranial Changes in Down Syndrome ». *Osong Public Health and Research Perspectives* 5 (6): 339-44. <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2014.09.004>.
- Song, Juhyun, Kyung Park, Won Lee, et Jong Lee. 2014. « Apoptosis Signal Regulating Kinase 1 (ASK1): Potential as a Therapeutic Target for Alzheimer's Disease ». *International Journal of Molecular Sciences* 15 (2): 2119-29. <https://doi.org/10.3390/ijms15022119>.

- Song, Woo-Joo, Sul-Hee Chung, et David M. Kurnit. 1997. « The Murine Dyrk Protein Maps to Chromosome 16, Localizes to the Nucleus, and Can Form Multimers ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 231 (3): 640-44. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6154>.
- Song, Woo-Joo, Eun-Ah Christine Song, Min-Su Jung, Sun-Hee Choi, Hyung-Hwan Baik, Byung Kwan Jin, Jeong Hee Kim, et Sul-Hee Chung. 2015. « Phosphorylation and Inactivation of Glycogen Synthase Kinase 3 β (GSK3 β) by Dual-Specificity Tyrosine Phosphorylation-Regulated Kinase 1A (Dyrk1A) ». *Journal of Biological Chemistry* 290 (4): 2321-33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.594952>.
- Soppa, Ulf, Julian Schumacher, Victoria Florencio Ortiz, Tobias Pasqualon, Francisco Tejedor, et Walter Becker. 2014. « The Down Syndrome-Related Protein Kinase DYRK1A Phosphorylates P27^{Kip1} and Cyclin D1 and Induces Cell Cycle Exit and Neuronal Differentiation ». *Cell Cycle* 13 (13): 2084-2100. <https://doi.org/10.4161/cc.29104>.
- Souchet, Benoit, Arnaud Duchon, Yuchen Gu, Julien Dairou, Claire Chevalier, Fabrice Daubigney, Valérie Nalesso, et al. 2019. « Prenatal Treatment with EGCG Enriched Green Tea Extract Rescues GAD67 Related Developmental and Cognitive Defects in Down Syndrome Mouse Models ». *Scientific Reports* 9 (1): 3914. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40328-9>.
- Souchet, Benoit, Fayçal Guedj, Zsuzsa Penke-Verdier, Fabrice Daubigney, Arnaud Duchon, Yann Herault, Jean-Charles Bizot, et al. 2015. « Pharmacological correction of excitation/inhibition imbalance in Down syndrome mouse models ». *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 9 (octobre). <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00267>.
- Souchet, Benoit, Fayçal Guedj, Ignasi Sahún, Arnaud Duchon, Fabrice Daubigney, Anne Badel, Yuchio Yanagawa, et al. 2014. « Excitation/Inhibition Balance and Learning Are Modified by Dyrk1a Gene Dosage ». *Neurobiology of Disease* 69 (septembre): 65-75. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.04.016>.
- Soundararajan, Meera, Annette K. Roos, Pavel Savitsky, Panagis Filippakopoulos, Arminja N. Kettenbach, Jesper V. Olsen, Scott A. Gerber, Jeyanthi Eswaran, Stefan Knapp, et Jonathan M. Elkins. 2013. « Structures of Down Syndrome Kinases, DYRKs, Reveal Mechanisms of Kinase Activation and Substrate Recognition ». *Structure* 21 (6): 986-96. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.03.012>.
- Starbuck, John M., Tara Dutka, Tabettha S. Ratliff, Roger H. Reeves, et Joan T. Richtsmeier. 2014. « Overlapping Trisomies for Human Chromosome 21 Orthologs Produce Similar Effects on Skull and Brain Morphology of Dp(16)1Yey and Ts65Dn Mice ». *American Journal of Medical Genetics Part A* 164 (8): 1981-90. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36594>.
- Stensen, Wenche, Ulli Rothweiler, Richard Alan Engh, Melissa R. Stasko, Ilya Bederman, Alberto C. S. Costa, Anders Fugelli, et John S. Mjølén Svendsen. 2021. « Novel DYRK1A Inhibitor Rescues Learning and Memory Deficits in a Mouse Model of Down Syndrome ». *Pharmaceuticals* 14 (11): 1170. <https://doi.org/10.3390/ph14111170>.
- Sureshbabu, Rengasamy, Rashmi Kumari, Subramaniam Ranugha, Ramanathan Sathyamoorthy, Carounanidy Udayashankar, et Paquirissamy Oudeacoumar. 2011. « Phenotypic and Dermatological Manifestations in Down Syndrome ». *Dermatology Online Journal* 17 (2): 3.
- Swulius, M. T., et M. N. Waxham. 2008. « Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinases ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 65 (17): 2637-57. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8086-2>.
- Szafłarska-Popławska, Anna, Anetta Soroczyńska-Wrzyszcz, Ewa Barg, Jan Józefczuk, Bartosz Korczowski, Urszula Grzybowska-Chlebowczyk, Sabina Więcek, et Bożena Cukrowska. 2016.

- « Assessment of coeliac disease prevalence in patients with Down syndrome in Poland – a multi-centre study ». *Gastroenterology Review* 1: 41-46. <https://doi.org/10.5114/pg.2016.57794>.
- Tejedor, F, X.R Zhu, E Kaltenbach, A Ackermann, A Baumann, I Canal, M Heisenberg, K.F Fischbach, et O Pongs. 1995. « Minibrain: A New Protein Kinase Family Involved in Postembryonic Neurogenesis in *Drosophila* ». *Neuron* 14 (2): 287-301. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90286-4](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90286-4).
- The Down Syndrome Cognition Project, Marie Moore Channell, Laura J. Mattie, Debra R. Hamilton, George T. Capone, E. Mark Mahone, Stephanie L. Sherman, Tracie C. Rosser, Roger H. Reeves, et Luther G. Kalb. 2021. « Capturing Cognitive and Behavioral Variability among Individuals with Down Syndrome: A Latent Profile Analysis ». *Journal of Neurodevelopmental Disorders* 13 (1): 16. <https://doi.org/10.1186/s11689-021-09365-2>.
- Thomas, Kelly, Jenny Bourke, Sonya Girdler, Ami Bebbington, Peter Jacoby, et Helen Leonard. 2011. « Variation Over Time in Medical Conditions and Health Service Utilization of Children with Down Syndrome ». *The Journal of Pediatrics* 158 (2): 194-200.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2010.08.045>.
- Thomazeau, A., O. Lassalle, J. Iafrati, B. Souchet, F. Guedj, N. Janel, P. Chavis, J. Delabar, et O. J. Manzoni. 2014. « Prefrontal Deficits in a Murine Model Overexpressing the Down Syndrome Candidate Gene *Dyrk1a* ». *Journal of Neuroscience* 34 (4): 1138-47. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2852-13.2014>.
- Ting, Michelle A. J. 2011. « What's Your Diagnosis? » *Journal of Pediatric Ophthalmology & Strabismus* 48 (1): 10. <https://doi.org/10.3928/01913913-20110106-02>.
- Tournier, J-Donald, Robert Smith, David Raffelt, Rami Tabbara, Thijs Dhollander, Maximilian Pietsch, Daan Christiaens, Ben Jeurissen, Chun-Hung Yeh, et Alan Connelly. 2019. « MRtrix3: A Fast, Flexible and Open Software Framework for Medical Image Processing and Visualisation ». *NeuroImage* 202 (novembre): 116137. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.116137>.
- Tulving, E. 1972. « Organization of Memory ». In *Episodic and Semantic Memory. In Organization of Memory*, 381-403. New York, NY: Cambridge, MA. <https://www.scirp.org/reference/referencespapers.aspx?referenceid=2919588>.
- Tungate, Andrew S., et Frances A. Conners. 2021. « Executive Function in Down Syndrome: A Meta-Analysis ». *Research in Developmental Disabilities* 108 (janvier): 103802. <https://doi.org/10.1016/j.ridd.2020.103802>.
- Tunstall, Oliver, Neha Bhatnagar, Beki James, Alice Norton, Aengus S. O'Marcaigh, Tim Watts, Anne Greenough, et al. 2018. « Guidelines for the Investigation and Management of Transient Leukaemia of Down Syndrome ». *British Journal of Haematology* 182 (2): 200-211. <https://doi.org/10.1111/bjh.15390>.
- Vicari, S., L. Marotta, et G. A. Carlesimo. 2004. « Verbal Short-Term Memory in Down's Syndrome: An Articulatory Loop Deficit? » *Journal of Intellectual Disability Research* 48 (2): 80-92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2788.2004.00478.x>.
- Vicari, Stefano. 2006. « Motor Development and Neuropsychological Patterns in Persons with Down Syndrome ». *Behavior Genetics* 36 (3): 355-64. <https://doi.org/10.1007/s10519-006-9057-8>.

- Vicari, Stefano, Samantha Bellucci, et Giovanni Augusto Carlesimo. 2000. « Implicit and Explicit Memory: A Functional Dissociation in Persons with Down Syndrome ». *Neuropsychologia* 38 (3): 240-51. [https://doi.org/10.1016/S0028-3932\(99\)00081-0](https://doi.org/10.1016/S0028-3932(99)00081-0).
- Vogel-Ciernia, Annie, et Marcelo A. Wood. 2014. « Examining Object Location and Object Recognition Memory in Mice ». *Current Protocols in Neuroscience* 69 (1). <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0831s69>.
- Voronov, Sergey V., Samuel G. Frere, Silvia Giovedi, Elizabeth A. Pollina, Christelle Borel, Hong Zhang, Cecilia Schmidt, et al. 2008. « Synaptojanin 1-Linked Phosphoinositide Dyshomeostasis and Cognitive Deficits in Mouse Models of Down's Syndrome ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (27): 9415-20. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803756105>.
- Wang, Zhen-Bo, Heide Schatten, et Qing-Yuan Sun. 2011. « Why Is Chromosome Segregation Error in Oocytes Increased With Maternal Aging? » *Physiology* 26 (5): 314-25. <https://doi.org/10.1152/physiol.00020.2011>.
- Watt, Tanisha, Kenneth Robertson, et Robert John Jacobs. 2015. « Refractive Error, Binocular Vision and Accommodation of Children with Down Syndrome ». *Clinical and Experimental Optometry* 98 (1): 3-11. <https://doi.org/10.1111/cxo.12232>.
- Wegiel, Jerzy, Izabela Kuchna, Krzysztof Nowicki, Janusz Frackowiak, Karol Dowjat, Wayne P Silverman, Barry Reisberg, et al. 2004. « Cell Type- and Brain Structure-Specific Patterns of Distribution of Minibrain Kinase in Human Brain ». *Brain Research* 1010 (1-2): 69-80. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.03.008>.
- Weijerman, Michel E., Chantal J. M. Broers, et Roos N. van der Plas. 2013. « [New insights into the support of children with Down syndrome] ». *Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde* 157 (6): A5330.
- Weijerman, Michel E., et J. Peter de Winter. 2010. « Clinical Practice: The Care of Children with Down Syndrome ». *European Journal of Pediatrics* 169 (12): 1445-52. <https://doi.org/10.1007/s00431-010-1253-0>.
- Whittle, Nigel, Simone B. Sartori, Mara Dierssen, Gert Lubec, et Nicolas Singewald. 2007. « Fetal Down Syndrome Brains Exhibit Aberrant Levels of Neurotransmitters Critical for Normal Brain Development ». *Pediatrics* 120 (6): e1465-71. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-3448>.
- Widowati, Esti Wahyu, Simone Bamberg-Lemper, et Walter Becker. 2018. « Mutational Analysis of Two Residues in the DYRK Homology Box of the Protein Kinase DYRK1A ». *BMC Research Notes* 11 (1): 297. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3416-4>.
- Winters, B. D. 2005. « Transient Inactivation of Perirhinal Cortex Disrupts Encoding, Retrieval, and Consolidation of Object Recognition Memory ». *Journal of Neuroscience* 25 (1): 52-61. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3827-04.2005>.
- Wiseman, Frances K., Tamara Al-Janabi, John Hardy, Annette Karmiloff-Smith, Dean Nizetic, Victor L. J. Tybulewicz, Elizabeth M. C. Fisher, et André Strydom. 2015. « A Genetic Cause of Alzheimer Disease: Mechanistic Insights from Down Syndrome ». *Nature Reviews Neuroscience* 16 (9): 564-74. <https://doi.org/10.1038/nrn3983>.

Wisniewski, K. E. 1990. « Down Syndrome Children Often Have Brain with Maturation Delay, Retardation of Growth, and Cortical Dysgenesis ». *American Journal of Medical Genetics. Supplement* 7: 274-81. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320370755>.

Wisniewski, K. E., H. M. Wisniewski, et G. Y. Wen. 1985. « Occurrence of Neuropathological Changes and Dementia of Alzheimer's Disease in Down's Syndrome ». *Annals of Neurology* 17 (3): 278-82. <https://doi.org/10.1002/ana.410170310>.

Yang, Quanhe, Stephanie L. Sherman, Terry J. Hassold, Katherine Allran, Lisa Taft, Dorothy Pettay, Muin J. Khoury, J. David Erickson, et Sallie B. Freeman. 1999. « Risk Factors for Trisomy 21: Maternal Cigarette Smoking and Oral Contraceptive Use in a Spopulation-Based Case-Control Study ». *Genetics in Medicine* 1 (3): 80-88. <https://doi.org/10.1097/00125817-199903000-00004>.

Yoon, P. W., S. B. Freeman, S. L. Sherman, L. F. Taft, Y. Gu, D. Pettay, W. D. Flanders, M. J. Khoury, et T. J. Hassold. 1996. « Advanced Maternal Age and the Risk of Down Syndrome Characterized by the Meiotic Stage of Chromosomal Error: A Population-Based Study ». *American Journal of Human Genetics* 58 (3): 628-33.

Yu, Tao, Chunhong Liu, Pavel Belichenko, Steven J. Clapcote, Shaomin Li, Annie Pao, Alexander Kleschevnikov, 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 Research* 1366 (décembre): 162-71. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.09.107>.

Zachor, Ditzza A., Elizabeth Mroczek-Musulman, et Pamela Brown. 2000. « Prevalence of Celiac Disease in Down Syndrome in the United States ». *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 31 (3): 275-79. <https://doi.org/10.1097/00005176-200009000-00014>.

Validation d'inhibiteurs de la kinase DYRK1A optimisés pour améliorer les capacités cognitives sur des modèles rongeurs du syndrome de Down

Résumé

Le syndrome de Down (SD) qui est dû à une trisomie du chromosome 21 humain, est l'une des causes majeures de déficiences intellectuelles. Parmi les gènes trisomiques dans le SD, le rôle crucial du surdosage du gène *Dyrk1a* (Dual-specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinases 1A) a été mis en évidence dans l'apparition des phénotypes observés dans le SD. Du fait de ses nombreuses fonctions et en particulier en raison de sa fonction catalytique, le surdosage du gène *Dyrk1a* conduit à des déficiences intellectuelles et des dysmorphies faciales comme celles observées dans le SD. De plus, il est important de noter qu'un sous-dosage de *Dyrk1a* conduit également au syndrome de MRD7 (Mental Retardation Autosomal Dominant 7). Au cours de ce projet, nous avons validé et caractérisé deux nouveaux modèles rats : l'un présentant une haploinsuffisance du gène *Dyrk1a* afin d'étudier l'impact de la perturbation du dosage de *Dyrk1a* dans les syndromes de Down et de MRD7. Nous avons aussi tenté d'identifier de nouveaux potentiels interacteurs de DYRK1A dans le but de mieux comprendre les mécanismes d'action de DYRK1A et par conséquent les voies de signalisations perturbées dans le sous dosage ou le surdosage de la protéine DYRK1A. De nombreuses études ont montré que l'inhibition de l'activité kinase de DYRK1A permet de corriger les déficits mnésiques des modèles souris du SD. Le projet central de cette étude a été l'analyse de nouveaux inhibiteurs de la kinase DYRK1A, dérivés de la Leucettine 41 chez des modèles de souris et de rats du SD.

Mots-clés : Syndrome de Down, DYRK1A, Leucettinibs, Modèles murins, MRD7

Abstract

Down syndrome (DS), which is caused by the trisomy of human chromosome 21, is one of the major causes of intellectual disabilities. Among trisomic genes in DS, the crucial role of overdose of the *Dyrk1a* gene (Dual-specificity tyrosine-phosphorylation regulated kinases 1A) has been highlighted in the apparition of phenotypes observed in DS. Because of its many functions and especially because of its catalytic function, overdose of *Dyrk1a* gene leads to intellectual disabilities and facial dysmorphies such as those observed in DS. In addition, it is important to note that an underdosage of *Dyrk1a* also leads to MRD7 syndrome (Mental Retardation Autosomal Dominant 7). During this project, we validated and characterized two new rat models: one with a haploinsufficiency another with a trisomy of *Dyrk1a* gene to study the impact of *Dyrk1a* gene dosage in DS and MRD7 syndrome. We also attempted to identify new potential DYRK1A interactors to better understand the mechanisms of action of DYRK1A and consequently the signaling pathways disrupted in the underdosage or overdose of DYRK1A protein. Numerous studies have shown that inhibiting the kinase activity of DYRK1A corrects memory deficits in mouse models of DS. The central project of this study was the analysis of new DYRK1A kinase inhibitors, derived from Leucettin 41 in mouse and rats SD models.

Keywords: Down syndrome, DYRK1A, Leucettinibs, mouse models, MRD7