

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

IEM CNRS UMR6218 Orléans et IGBMC INSERM U964, UMR7104 Strasbourg

THÈSE présentée par : **Emilie DALLONEAU**

soutenue le : **24 Septembre 2010**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université d'Orléans**
Discipline : Biologie option génétique et physiologie moléculaire

Identification de gènes à effet de dose impliqués dans la pathophysiologie des aneuploïdies associées au chromosome 21

THÈSE dirigée par :
Yann HERAULT

DR CNRS, IGBMC Strasbourg

THÈSE co-dirigée par :
Jacques LIGNON

CR CNRS, IEM Orléans

RAPPORTEURS :
Nelly FROSSARD
Marie-Claude POTIER

DR INSERM, Faculté de Pharmacie Strasbourg
DR CNRS, ESPCI Paris

JURY :

Nelly FROSSARD
Marie-Claude POTIER
François ERARD
Jean-Maurice DELABAR
Jacques LIGNON
Yann HERAULT

DR INSERM, Faculté de Pharmacie Strasbourg
DR CNRS, ESPCI Paris
Professeur de l'université d'Orléans, Président du Jury
DR, CNRS, Université Paris Diderot
CR CNRS, IEM Orléans
DR CNRS, IGBMC Strasbourg

Table des matières

Tables des illustrations	7
Abréviations	13
Introduction	18
I. Les aneuploïdies liées au chromosome 21 humain	19
A. <i>Le chromosome 21 humain (HSA21)</i>	19
B. <i>Les origines des aneuploïdies du HSA21</i>	21
C. <i>La Monosomie 21</i>	22
1. Généralités et signes cliniques	22
2. Exemples de Monosomies 21	22
3. Hétérogénéité de la Monosomie 21	26
4. Les relations génotypes-phénotypes	26
D. <i>Les similitudes des phénotypes dans la Monosomie et la Trisomie et la contribution allélique</i>	29
E. <i>La Trisomie 21 (T21) ou syndrome de Down (SD)</i>	30
1. Caractéristiques cytogénétiques	30
2. Les facteurs de risques	32
3. Les signes cliniques	33
4. Les désordres biochimiques	39
5. Les pathologies associées	40
6. La variabilité phénotypique de la Trisomie 21	44
7. Les corrélations génotypes-phénotypes	44
II. Induction d'un stress respiratoire et de l'inflammation du poumon, par le lipopolysaccharide	48
A. <i>Le lipopolysaccharide et la voie de signalisation associée au TLR4</i>	49
1. Reconnaissance du lipopolysaccharide par le TLR4	49
2. Rôle des molécules adaptatrices dans l'induction de l'inflammation	51
3. L'activation de la voie NF- κ B	54
B. <i>L'inflammation des voies respiratoires</i>	55
1. Le recrutement des neutrophiles	55
2. L'importance des molécules de signalisation dans le recrutement des neutrophiles	56

C. <i>La bronchoconstriction induite par le LPS</i>	57
1. Définition et mesure.....	57
2. Les effecteurs de la bronchoconstriction.....	58
III. Les modèles murins de Monosomie et Trisomie 21	60
A. <i>Limites des études chez l'homme-nécessité des modèles animaux</i>	60
B. <i>Les homologues entre l'homme et la souris</i>	61
C. <i>Les modèles murins du syndrome de Down</i>	63
1. Les modèles de surexpression de gènes candidats.....	63
2. La trisomie complète.....	65
3. La trisomie Ts16.....	65
4. Le modèle transchromosomique Tc1.....	66
5. Les modèles de trisomies partielles.....	66
D. <i>Les modèles de monosomies partielles</i>	72
1. Le modèle Ms1Rhr.....	72
2. Le modèle Ms1Cje.....	73
IV. Le modèle de monosomie Ms1Yah pour la région <i>Prmt2-Col6a1</i>	74
A. <i>Les gènes de la région <i>Prmt2-Col6a1</i></i>	75
B. <i>Induction de la délétion <i>Prmt2-Col6a1</i> in vivo</i>	76
C. <i>Analyse phénotypique de la lignée Ms1Yah</i>	77
D. <i>Les gènes candidats</i>	78
1. Le gène <i>Prmt2</i>	78
2. La lignée murine <i>Prmt2^{tm1Enbl}</i>	79
3. Le gène <i>S100B</i>	80
4. La lignée <i>S100B^{tm1Daoh}</i>	84
V. Le projet de recherche	85
Matériels et Méthodes	87
I. Génotypage	88
A. <i>Extraction d'ADN génomique</i>	88
B. <i>La méthode de southern blot</i>	88
1. Réalisation d'une sonde marquée à la digoxigénine.....	88
2. Digestion enzymatique d'ADN génomique et transfert sur membrane de nitro cellulose.....	90
3. Hybridation et révélation de la sonde marquée.....	91

4. Ré-hybridation de la membrane de nitro cellulose.....	92
C. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	92
II. Prélèvements des cellules de la moelle osseuse et différenciation en macrophages	93
A. Prélèvement des cellules.....	93
B. Mise en culture et différenciation en macrophages.....	93
III. Induction de la réponse inflammatoire par le lypopolysaccharide	94
A. In vitro.....	94
1. Stimulation pour le dosage des cytokines.....	94
2. Stimulation en vue de l'extraction d'ARN.....	95
B. In vivo.....	95
1. Induction d'une réponse systémique.....	95
2. Induction d'une réponse locale.....	96
IV. Etude de l'expression des gènes <i>IL-6</i>, <i>TNF-α</i> et des gènes de la région <i>Prmt2-Col6a1</i>	98
A. Extraction d'ARN.....	98
1. A partir des cellules.....	98
2. A partir des poumons.....	99
B. Mesure de la quantité et de la qualité de l'ARN extrait.....	99
1. Mesure de la concentration.....	99
2. Evaluation de la qualité.....	100
C. La réaction de Reverse-Transcription (RT-PCR).....	100
D. La réaction de polymérisation en chaîne quantitative (Q-PCR).....	100
V. Mesure de la bronchoconstriction	101
VI. Etude de la réponse inflammatoire	103
A. Le dosage des cytokines par la méthode ELISA.....	103
B. Le dosage de l'activité myéloperoxydase (MPO).....	104
C. Le recrutement cellulaire dans les poumons.....	104
VII. Etude de la localisation de la protéine S100B	106
VIII. Le modèle d'induction de l'asthme	107
A. La sensibilisation à l'allergène.....	107
B. Le challenge à l'allergène.....	108
IX. Analyse statistique	108

Résultats	111
I. Etude de l'implication du gène <i>Prmt2</i> dans la réponse inflammatoire au LPS	112
A. <i>Etude de la réponse inflammatoire des lignées Ms1Yah, <i>Prmt2</i>^{+/-} et B6</i>	112
1. Analyse de la réponse inflammatoire dans les BALFs	113
2. Mesure de la réponse sérique	116
3. Mesure de la concentration en cytokines produites par les macrophages	117
B. <i>Etude de l'expression des gènes <i>Prmt2</i>, <i>IL-6</i> et <i>TNF-α</i> par Q-PCR</i>	119
1. Analyse <i>in vivo</i> : à partir des poumons	119
2. Analyse <i>in vitro</i> : à partir des macrophages	121
C. <i>Evaluation de la fonction respiratoire des souris <i>Prmt2</i>^{+/-}</i>	122
II. Recherche par Q-PCR de nouveaux gènes candidats pour les phénotypes observés	124
A. <i>Etude in vitro, à partir des macrophages</i>	124
B. <i>Etude in vivo, à partir des poumons</i>	125
III. Evaluation du rôle de <i>S100B</i> dans les phénotypes d'inflammation et d'hyper réponse des voies aériennes observés dans la lignée Ms1Yah	127
A. <i>Etude de la cinétique de la concentration en <i>S100B</i>, au cours de l'inflammation induite par le LPS, chez la souris sauvage</i>	127
1. Etude de la réponse inflammatoire dans les BALFs	128
2. Etude de la réponse inflammatoire systémique	129
B. <i>Etude de la perte de fonction de <i>S100B</i> sur la fonction pulmonaire après stimulation par le LPS</i>	130
C. <i>Etude de la réponse inflammatoire, induite par le LPS, chez les souris <i>S100B</i>^{+/-} et <i>S100B</i>^{-/-}</i>	132
1. Analyse de la réponse inflammatoire dans les BALFs	133
2. Analyse de la réponse inflammatoire systémique	135
D. <i>Etude de la localisation de la protéine <i>S100B</i> dans le poumon</i>	136
IV. Utilisation d'un anticorps pour bloquer l'activité <i>S100B</i>	140
A. <i>Test de l'anticorps anti-<i>S100B</i> chez les souris sauvages <i>S100B</i></i>	140
1. Etude de la fonction pulmonaire	140
2. Analyse de la réponse inflammatoire dans les BALFs	141
B. <i>Test de l'anticorps anti-<i>S100B</i> chez les souris <i>Prmt2</i>^{+/-}</i>	143
1. Etude de la réponse pulmonaire	143
2. Etude de la réponse inflammatoire dans les BALFs	144

V. Utilisation de l'anti-S100B dans un modèle d'asthme.....	146
A. <i>Suivit de la production de S100B.....</i>	<i>147</i>
B. <i>Action de l'anticorps sur l'hyper réponse des voies aériennes.....</i>	<i>148</i>
Conclusions-Discussion.....	150
I. La réponse inflammatoire.....	151
1. Le rôle du gène <i>Prmt2</i>	152
2. Le rôle du gène <i>S100B</i>	154
II. Etude de la fonction pulmonaire.....	156
1. La pléthysmographie non invasive.....	156
2. <i>Prmt2</i> et l'hyper réponse des voies aériennes.....	157
3. <i>S100B</i> et l'hyper réponse des voies aériennes.....	158
III. Interaction entre <i>Prmt2</i> et <i>S100B</i>.....	159
IV. Utilisation de l'anticorps anti-S100B et perspectives thérapeutiques.....	160
1. Validation de l'inhibition de l'activité de S100B par l'anti-S100B.....	160
2. Utilisation de l'anti-S100B dans un modèle d'asthme.....	160
V. Inflammation pulmonaire et Trisomie 21.....	161
Perspectives.....	163
Bibliographie.....	166
Annexes.....	186

Table des illustrations

Les figures

<i>Figure 1 : Le chromosome 21 humain (HSA21).</i>	20
<i>Figure 2 : Schéma de non disjonction chromosomique en première et en deuxième division méiotique.</i>	21
<i>Figure 3: Analyses par FISH de noyau en métaphase.</i>	25
<i>Figure 4: Carte phénotypique assignant 23 caractères de monosomie 21 partielle à différentes régions du HSA21 (tiré de Chettouh et al. 1995).</i>	28
<i>Figure 5: Visualisation d'un chromosome 21 surnuméraire par un caryotype (A) et par FISH (B).....</i>	31
<i>Figure 6: Cartographie moléculaire de 24 phénotypes du SD sur le HSA21 (d'après Delabar et al. 1993).....</i>	46
<i>Figure 7: Représentation schématique de la structure du LPS provenant de E coli (tirée de Samuel et al. 2005).....</i>	50
<i>Figure 8: Voie de transduction du LPS.</i>	52
<i>Figure 9: Chromosomes murins (MMU) homologues au chromosome 21 humain (HSA21).</i> .62	
<i>Figure 10: Analyse de la prise de poids durant 60 jours après la naissance chez les souris Ms1Rhr et Ts1Rhr par rapport aux souris contrôles euploïdes (tiré de Olson et al. 2004).</i>	70
<i>Figure 11: Etude de l'apprentissage spatiale chez les souris Ts1Yah..</i>	71
<i>Figure 12: Représentation schématique des régions homologues au HSA21 tripliquées dans les lignées Tc1 Ts16, Dup(16)Yu, Ts65Dn, Ts1Cje, Ts1Rhr, Ms1Cje/Ts65Dn et Ms1Rhr/Ts65Dn.</i>	74
<i>Figure 13: Représentation des gènes de la région Prmt2-Col6a1 sur le MMU10, homologue à la partie distale du HSA21. Tirée de Ensembl version 57.....</i>	75
<i>Figure 14: Réponse inflammatoire et bronchoconstriction chez les souris Ms1Yah.</i>	78
<i>Figure 15: Représentation de la recombinaison homologue entre le vecteur cible et le gène Prmt2. Tiré de Yoshimoto et al. 2006.</i>	80
<i>Figure 16: modèle proposé par Donato et al. (2009) pour l'activation des monocytes par la voie S100B-RAGE-NFκB.....</i>	84

<i>Figure 17: Structure de l'allèle S100B sauvage, du vecteur cible et de l'allèle S100B recombiné. Tiré de Xiong et al. 2000.</i>	85
<i>Figure 18: Neutrophiles et macrophages pulmonaires entourés de nombreux globules rouges et de quelques plaquettes.</i>	105
<i>Figure 19: Caractérisation de la réponse inflammatoire induite par le LPS, dans les BALFs des souris B6 (en blanc) et Prmt2^{+/-} (en noir) (n=10 par groupe).</i>	114
<i>Figure 20: Caractérisation des différents types cellulaires présents dans les BALFs (NaCl n=5, LPS n=10 par lignée).</i>	115
<i>Figure 21: Mesure de l'activité myéloperoxydase (Absorbance : 460 nm).</i>	116
<i>Figure 22 : Caractérisation de la réponse inflammatoire induite par le LPS, dans le sérum des souris Ms1Yah, Prmt2^{+/-} et B6 (n=10 par groupe).</i>	117
<i>Figure 23: Caractérisation de la réponse inflammatoire induite par le LPS, dans le surnageant des macrophages des souris B6, Ms1Yah, Prmt2^{+/-} et Prmt2^{-/-} (n=5 par groupe).</i>	118
<i>Figure 24: Mesure de l'expression des gènes TNF-α, IL-6 et Prmt2, dans les poumons des souris B6, Ms1Yah et Prmt2^{+/-} après stimulation LPS ou NaCl (n=5 par groupe).</i>	120
<i>Figure 25: Mesure de l'expression des gènes TNF-α, IL-6 et Prmt2, dans des macrophages des souris B6, Ms1Yah et Prmt2^{+/-} après stimulation LPS ou NaCl (n=5 par groupe).</i>	122
<i>Figure 26: Mesure de la résistance des voies respiratoires des souris B6 et Prmt2^{+/-} instillées au LPS (n=10) ou NaCl (n=5).</i>	123
<i>Figure 27: Analyse de l'expression des gènes Lss, Mcm3ap, Pcnt2 et S100B dans les macrophages des souris B6 et Ms1Yah.</i>	125
<i>Figure 28: Analyse de l'expression des gènes Lss, Mcm3ap, Pcnt2 et S100B dans les poumons des souris B6 et Ms1Yah.</i>	126
<i>Figure 29 : Cinétique de la réponse inflammatoire induite par le LPS, dans les BALFs de souris B6 (n=5 par groupe) aux temps 0, 2h, 4h et 6h.</i>	129
<i>Figure 30: Concentration en TNF-α, IL-6 et S100B dans le sérum de souris B6 stimulées au LPS, aux temps 0, 30min, 2h, 4h et 6h.</i>	130
<i>Figure 31: Mesure de la HRA chez les souris S100B^{+/-} et B6 stimulées au LPS.</i>	131
<i>Figure 32: Mesure de l'HRA chez les souris S100B^{-/-} et B6 stimulées au LPS ou NaCl.</i>	132
<i>Figure 33: Caractérisation des différents types cellulaires présents dans les BALFs des lignées B6 et S100B^{-/-}.</i>	133

Figure 34: Caractérisation de la réponse inflammatoire induite par le LPS, dans les BALFs des souris B6 (gris clair), S100B ^{+/+} (gris) et S100B ^{-/-} (gris foncé).....	134
Figure 35: Mesure de l'activité myéloperoxydase (Absorbance : 460 nm).	134
Figure 36: Caractérisation de la réponse inflammatoire induite par le LPS, dans le sérum des souris S100B ^{+/+} , S100B ^{-/-} et contrôles.....	135
Figure 37: Détection de l'expression de S100B dans les bronches de souris B6 stimulée au NaCl (à gauche) ou au LPS (à droite).	137
Figure 38: détection par immunohistochimie de S100B sur coupe d'intestin.	137
Figure 39: Marquage des noyaux par le DAPI (bleu) (A), des nerfs par un anti-GFAP (vert) (B), de S100B (anti-S100B rouge) (C) et superposition des marquages nerfs/S100B (D).	138
Figure 40: Marquage des noyaux par le DAPI (bleu) (A), des cellules musculaires par un anti-actine (vert) (B), de S100B (anti-S100B rouge) (C) et superposition des marquages muscle/S100B (D).	139
Figure 41: Mesure de l'HRA chez des souris B6 stimulées au LPS ou NaCl, ayant reçu 1 ou 2mg d'anti-S100B..	141
Figure 42: Caractérisation des différents types cellulaires présents dans les BALFs des souris B6 traitées ou non avec l'anti-S100B.....	142
Figure 43: Caractérisation de la réponse inflammatoire induite par le LPS, dans les BALFs des souris B6 ayant reçu ou non l'anti-S100B.	142
Figure 44 : Mesure de l'activité myéloperoxydase (Absorbance : 460 nm).....	143
Figure 45: Mesure de l'HRA chez des souris Prmt2 ^{+/+} stimulées au LPS, ayant reçu ou non 2mg d'anti-S100B.	144
Figure 46: Caractérisation des différents types cellulaires présents dans les BALFs des souris B6 et Prmt2 ^{+/+} ayant reçu ou non l'anti-S100B.	145
Figure 47: Mesure de l'activité myéloperoxydase (Absorbance : 460 nm).	145
Figure 48: Caractérisation de la réponse inflammatoire induite par le LPS, dans les BALFs des souris B6 et Prmt2 ^{+/+} ayant reçu ou non l'anti-S100B.....	146
Figure 49: Cinétique de la concentration en S100B dans le sérum de souris BALB/cJ sensibilisées à l'ovalbumine lors de la dernière sensibilisation.	148
Figure 50: Mesure de l'HRA chez un modèle murin d'asthme.....	149
Figure 51: Résumé des gènes dont l'expression est modifiée, dans les cultures de cellules endothéliales, stimulées par S100B ou le LPS. Adaptée de Valencia et al. 2004.	156

<i>Figure 52: Expression du gène S100B dans les poumons des souris B6 (noir) Ms1Yah (gris) et Prmt2^{+/-} (gris clair) après stimulation LPS.</i>	<i>159</i>
--	------------

Les tables

<i>Table 1 : Traits phénotypiques associés à la monosomie 21 partielle (délétion 21q22) et leur fréquence d'apparition</i>	<i>27</i>
<i>Table 2: Signes cliniques rencontrés dans la trisomie 21 et leur fréquence d'apparition.</i>	<i>35</i>
<i>Table 3: Détails des régions d'homologie entre le chromosome humain et les chromosomes murins.</i>	<i>62</i>
<i>Table 4 : Nomenclature et localisation des protéines de la famille S100 chez l'homme et la souris. Adapté de Marenholz et al. 2004.</i>	<i>81</i>
<i>Table 5: Sondes d'ADN marquées à la digoxygénine utilisées pour la méthode de Southern.</i>	<i>89</i>
<i>Table 6: Lignées génotypées par la méthode de PCR.</i>	<i>92</i>

Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AGEs	Advanced Glycation Endproducts
ARN	Acide ribonucléique
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BALFs	Broncho-Alveolar Lavage Fluids
BET	Bromure d'éthidium
BMDM	Bone Marrow Derived Macrophages
BSA	Bovine Serum Albumine (albumine bovine sérique)
CDP-Star	Disodium 2-chloro-5-(4-méthoxy spiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro) [3.3.1.13,7]decan}-4-yl)-1-phenylphosphate tricyclo
Cellule ES	Cellule souche embryonnaire
CNGs	Conserved non genomic sequences (Séquences conservées non génomiques)
Coll.	Collaborateurs
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DIG	Digoxygénine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
EDTA	Ethylène DiamineTétraAcétate
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
g	Gramme
H	Heure
HCl	Acide chlorhydrique
HRA	Hyper-réponse des voies aériennes
HRP	HorseRadish Peroxydase

HSA	Homo sapiens
IL	Interleukine
IRM	Imagerie par résonance magnétique
kb	Kilobase
KCl	Chlorure de potassium
KO	Knock-Out
LPS	Lipopolysaccharide
M21	Monosomie 21
Mb	Mégabase
M-CSF	Macrophages Colony-Stimulating Factor
mg	Milligramme
MgCl₂	Chlorure de magnésium
MgSO₄	Sulfate de magnésium
MICER	Mutagenic Insertion and Chromosome Engineering Resource
Min	Minute
mm	Millimètre
mmol	Millimole
MMU	Mus musculus
MPO	MyéloPerOxydase
NaCl	Chlorure de sodium
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
ng	Nanogramme
PAC	P1 Artificial Chromosomes
Pb	Paire de base

PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)
PenH	Temps de pause respiratoire
PFA	ParaFormAldéhyde
PNN	PolyNucléaires Neutrophiles
QI	Quotient intellectuel
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction
qsp	Quantité Suffisante Pour
RAGE	Receptor for Advanced Glycation Endproducts
RIN	RNA Integrity Number
rpm	Rotation par minute
s	Seconde
SARM	Sterile Alpha and armadillo-Motif-containing protein
SD	Syndrome de Down
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polymorphisme simple nucléotide)
T21	Trisomie 21
TAMERE	Transallelic tArgeted MEiotic REcombination
TE	Tris EDTA
Tg	Transgénique
TIRAP	MyD88-Adaptator-Like
TLR	Toll Like Receptor
TNF-α	Tumor Necrosis Factor Alpha
TRAM	TRIF-related adaptator molecule

TRIF	TIR-domain-containing adaptator protein inducing IFN- β
U	Unité
μl	Microlitre
YAC	Yeast Artificial Chromosomes

Introduction

I. Les aneuploïdies liées au chromosome 21 humain

A. Le chromosome 21 humain (HSA21)

La structure et la composition génique du chromosome 21 humain (HSA21) ont été intensément étudiées. Grâce au développement des techniques de cytogénétique et de clonage positionnel c'est le premier autosome pour lequel les cartes de liaison, physique et de restriction ont été développées.

Chez l'homme, le chromosome 21, dont la taille est d'environ 46,9 Mb (selon le site <http://genome.cse.ucsc.edu/goldenPath/stats.html>), est le plus petit des autosomes. En 2000, le consortium international «Human Genome Project» publie la séquence quasi-complète (99,7%) du bras long (21q), soit 225 gènes et 59 pseudo-gènes (Hattori *et al.* 2000). La majorité des gènes est située sur le bras long (21q), seuls deux gènes, *BAGE* et *TPTE*, sont localisés sur le bras court (21p) dont la séquence n'est pas encore établie. Ils représenteraient environ 1% du génome (*Figure 1*). Cette densité relativement basse en gène validerait l'hypothèse que la T21 soit une des seules trisomies autosomales viables.

Régulièrement de nouveaux gènes sont identifiés, de nouvelles fonctions leur sont associées. A l'heure actuelle, le site Ensembl relève 249 gènes, 141 pseudo-gènes, 16 miRNA, 5 RNA ribosomiaux et 295 347 polymorphisme de simple nucléotide ou SNP (Single Nucleotide Polymorphism) (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/mapview?chr=21, version 57). En 2003, Gardiner *et al.* comparent la séquence du HSA21 avec les régions homologues chez la souris. A ce moment là, le chromosome 21 humain comptait plus de 300 gènes. 170 étaient fortement conservés entre l'homme et la souris, 83 gènes montraient des fragments de séquence identiques et étaient donc des orthologues putatifs, alors que 111 ne montraient pas d'homologie de séquence avec les régions de synténie murines. Ces données montrent que bien que la souris soit l'organisme le mieux adapté pour l'étude des aneuploïdies du HSA21, les modèles murins pourraient développer des phénotypes non observés chez l'homme, ou au contraire échouer à reproduire les phénotypes des patients (Gardiner *et al.* 2003).

En comparaison avec le HSA22 qui est également un des plus petits autosomes, le HSA21 contient 2 fois moins de gènes et comporte de larges régions qui en sont dépourvues.

La fonction de ces régions non codantes est méconnue, mais elles pourraient avoir un rôle structural ou fonctionnel.

De plus, la recherche d'homologie avec d'autres espèces permet de mettre en évidence des séquences conservées non-génomiques (CNGs). Ce sont des séquences non-codantes, qui pourraient jouer un rôle structural mais qui sont également importantes pour la régulation des gènes. En effet, des mutations de ces séquences peuvent être à l'origine de maladies telles que la polydactylie préaxiale, des défauts vertébraux voire même une β -thalassémie. Sur le HSA21, 2978 CNGs ont été identifiés avec une longueur moyenne de 150pb, elles sont réparties de manière non uniformes et sont inversement proportionnelles à la densité en gènes (Dermitzakis *et al.* 2005).

L'obtention de ces données sur la fonctions des gènes et des régions non codantes devrait accélérer et faciliter la compréhension de la pathophysiologie moléculaire de la trisomie 21, des désordres monogéniques du chromosome 21 et la découverte de nouveaux gènes de susceptibilité pour des traits polygéniques ou associés à des désordres complexes liés au HSA21 (Antonarakis *et al.* 2001 et 2002).

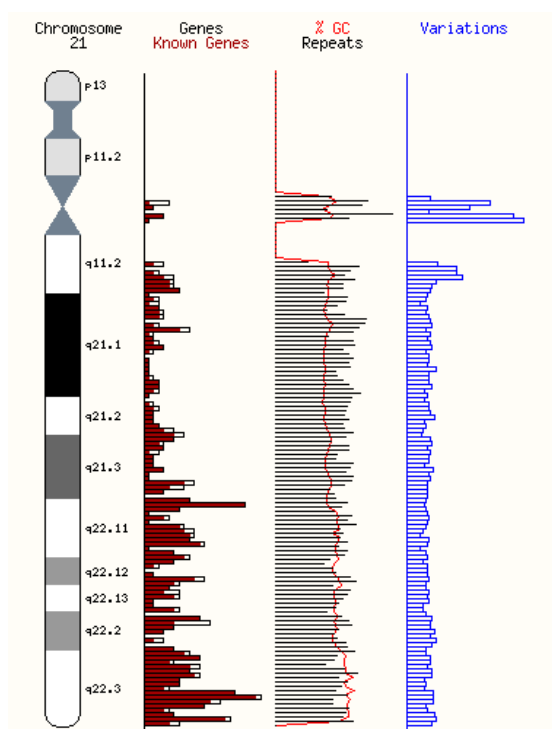


Figure 1 : Le chromosome 21 humain (HSA21). Aperçu de la répartition des gènes, du pourcentage de GC et du nombre de polymorphisme simple brin associé au chromosome 21. D'après Ensembl (www.ensembl.org; version 57).

B. Les origines des aneuploïdies du HSA21

L'aneuploïdie est causée par une non-disjonction d'un des deux chromosomes d'une même paire. Cette anomalie peut apparaître pendant la première (MI) ou la deuxième (MII) division de méiose (*Figure 2*).

Dans le premier cas, la migration simultanée des deux chromosomes homologues vers un même pôle aboutit à la formation de gamètes possédant deux ou aucun des chromosomes de cette paire. Ces gamètes donneront naissance après fécondation, à des descendants trisomiques ou monosomiques. Dans le cas d'une non-disjonction en MII, après fécondation, les cellules seront trisomiques, disomiques (euploïde) ou monosomiques.

Cette anomalie peut également apparaître pendant la mitose, une telle non disjonction chromosomique aboutit à un sous clone cellulaire aneuploïde. Ces individus ont donc une partie de leurs cellules aneuploïdes et sont dits mosaïques. D'autres facteurs comme des translocations chromosomiques lors de la formation des gamètes parentaux sont également à l'origine d'aneuploïdies partielles.

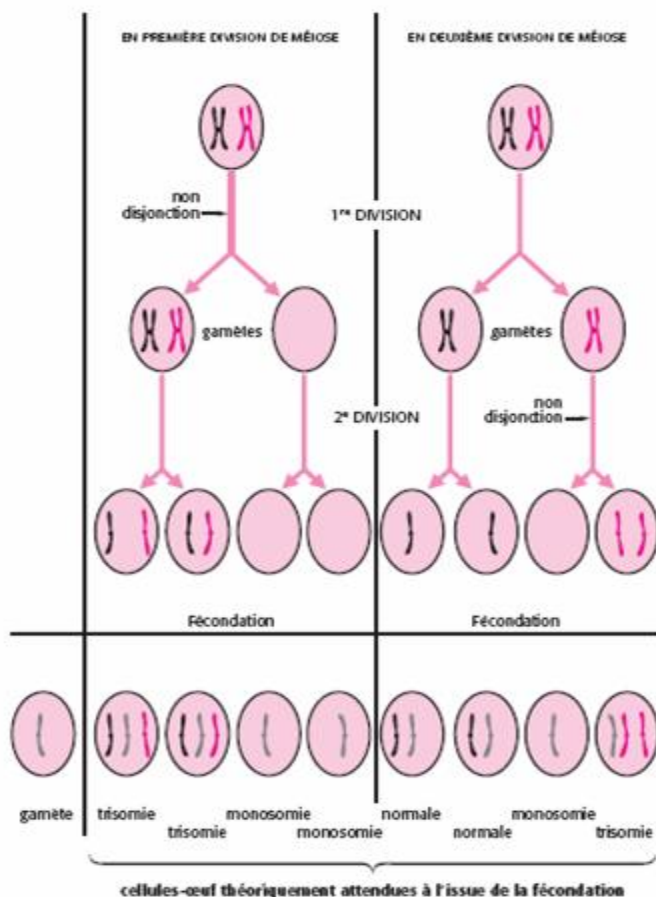


Figure 2 : Schéma de non disjonction chromosomique en première et en deuxième division méiotique.

C. La Monosomie 21 (M21)

1. Généralités et signes cliniques

Les monosomies autosomales sont rarement viables, seule la monosomie du chromosome X (ou syndrome de Turner) est viable. La monosomie 21 est une anomalie chromosomique due à une délétion partielle ou à une translocation déséquilibrée du chromosome 21. Les patients présentent des signes cliniques spécifiques dont certains sont retrouvés dans le syndrome de Trisomie 21. On observe un retard mental, un retard de croissance intra-utérine et une dysmorphie faciale assez caractéristique qui comprend une microcéphalie, un nez proéminent, une micrognathie, une fente labio-palatine et des commissures buccales inversées. Les infections respiratoires et gastro-intestinales sont récurrentes, ainsi que les malformations cardiaques (tétralogie de Fallot). Ces patients présentent également des manifestations oculaires telles que des cataractes, des glaucomes congénitaux de Peters, des microphthalmies, des fentes palpébrales antimongoloïdes et un épicanthus.

2. Exemples de Monosomie 21

Les monosomies autosomales sont à l'origine de malformations tellement importantes qu'elles conduisent le plus souvent à un arrêt du développement in utero et à une fausse couche spontanée. A ce jour, deux cas de Monosomie 21 complète ont été décrits. Le premier cas, décrit par Joosten *et al.* (1997), présente un fœtus décédé in utero avant la 16^{ème} semaine de gestation. Suite au décès, une analyse cytogénétique par FISH réalisée sur des fibroblastes de la peau, a confirmé une Monosomie 21 complète chez toutes les cellules testées. Une analyse ADN a même montré l'origine paternelle de l'unique chromosome 21. L'autopsie a révélé des anomalies rétiniennes dont les plus importantes sont : l'absence des chambres antérieure et postérieure de l'œil, une hypoplasie des corps ciliaires, une anomalie de Peter (opacité cornéenne centrale et lésions à l'iris affectant les deux yeux et qui conduit à la cécité) et une dysplasie secondaire. Des malformations des extrémités ont aussi été observées telles qu'une syndactylie partielle des doigts 3 et 4 de la main droite, ainsi qu'un pes varus au niveau du pied droit (le pied est basculé en arrière et en dedans, mais la malformation est

complètement réductible). Ces malformations ont été rapportées en plus de celles qui avaient déjà été observées dans des cas supposés de M21. Les analyses génétiques et les observations réalisées à l'autopsie ont fait de ce cas le premier cas de M21 complète confirmée.

En 2004, l'équipe de Mori a également diagnostiqué une monosomie 21 complète chez un fœtus de 32 semaines qui présentait un fort retard de croissance et une sévère microcéphalie. Il est né avec de multiples malformations congénitales dont une hypotonie, une microcéphalie, une microphthalmie bilatérale, des dysmorphies faciales, des plis palmaire et plantaire anormaux, un excès de peau au niveau du cou, une malformation du canal auditif, une cryptorchidie (absence d'un ou des deux testicules dans le scrotum), une hypospadias (présence d'un méat urinaire sur l'urètre), une micropénie, une camptodactylie (malformation des doigts qui se caractérise par une flexion permanente), une hypoplasie des ongles. Le nouveau-né est décédé quelques heures après l'accouchement. L'étude post-mortem a montré, entre autre, une microencéphalie, une holoprocéphalie semi-lobaire (les zones frontale et pariétale du cerveau sont fusionnées), une polymicrogyrie (cortex cérébral plus épais avec de multiples circonvolutions), des anomalies oculaires (microphthalmie, absence de cornée, de chambre antérieure et de la rétine), des anomalies squelettiques (comme des clavicules incurvées), des défauts cardiaques congénitaux (comme une hypertrophie ventriculaire) ainsi que l'absence d'un rein. L'analyse cytogénétique a confirmé le diagnostic prénatal de monosomie 21 complète, l'origine de l'unique chromosome 21 étant paternelle.

Concernant les autres cas de M21, ils ont été pour la plupart ré examinés en utilisant de nouvelles technologies et ont été diagnostiqués comme des translocations compensées, avec ou sans délétion. Par exemple, Riegel *et al.* (2005) ont utilisé les techniques de chromosome painting puis FISH et des marqueurs microsatellites pour déterminer une délétion partielle des chromosomes 18(q22-qter) et 21(pter-q21) chez un patient initialement diagnostiqué pour une M21 complète par un marquage en bande G (GTG) sur caryotype. Le garçon est né après 26 semaines de gestation et présentait des signes classiques de M21 tels qu'une hypotonie musculaire, un front large et proéminent, des fissures palpébrales obliques, un hypotélorisme (diminution anormale de l'espace entre les yeux), des plis épicanthiques (repli cutané vertical recouvrant l'angle intérieur de la paupière), une bouche large avec des lèvres proéminentes, un micropénis et une absence du testicule droit. A la naissance

l'électrocardiogramme est normal. Le patient a présenté une susceptibilité aux infections pulmonaires et a été hospitalisé à 13 mois pour une pneumonie. Le développement psychomoteur a été sévèrement retardé puisqu'il a marché sans assistance à l'âge de 20 ans. L'acquisition du langage correspond à celui d'un enfant de 2-3 ans. Le garçon a perdu de façon modérée mais progressive l'ouïe. Il ne présente pas d'anomalies visuelles. La puberté a été retardée et diminuée. La mobilité des membres est réduite avec des déformations au niveau métacarpe-phalange et inter-phalanges. Le caryotype original était 45,XY,-21 dans les 64 cellules en métaphase examinées. Ceux des parents étaient normaux. A ce moment le diagnostic posé était celui d'une M21 complète non mosaïque. A l'âge de 18 ans, un nouveau diagnostic a été réalisé afin de confirmer le premier et d'exclure une translocation déséquilibrée. Le développement des nouvelles techniques de cytogénétiques moléculaires a permis d'établir un nouveau caryotype avec une délétion partielle des chromosomes 18 et 21 (*Figure 3*). Les marqueurs microsatellites ont permis de localiser les points de cassure au niveau 18q22.2-q22.3 pour le chromosome 18 et au niveau 21q21.2-q21.3 pour le chromosome 21. Ce résultat explique l'absence de malformations congénitales chez le patient et le fait qu'il survive relativement bien. D'autre part, ces résultats montrent que la M21 partielle contribue principalement au phénotype du patient.

Plus récemment, Nguyen *et al.* (2009) ont décrit un cas de T21/M21 mosaïque chez une enfant. A la naissance, l'enfant montre des malformations qui ne sont pas toutes classiques du syndrome de Down mais qui sont retrouvées chez les patients présentant une M21 partielle. En effet, la petite fille présente un nez plat, un bec de lièvre, une syndactylie des doigts 3 et 4 de la main et du pied gauche, un espace important entre le premier et le second orteil (sandal gap).

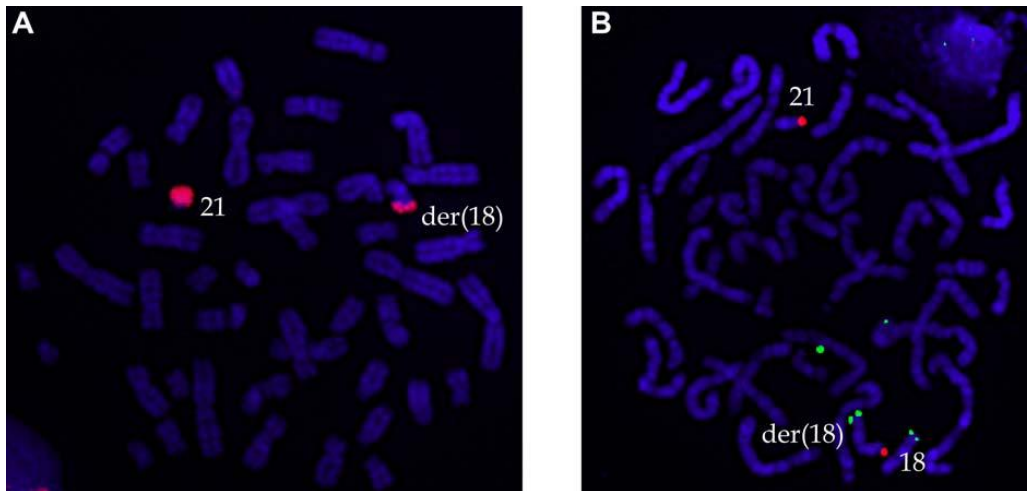


Figure 3: Analyses par FISH de noyau en métaphase. En A à gauche, le point rouge est caractéristique du HSA21 normal, et à droite il montre un petit segment du HSA21 transloqué sur le bras long du HSA18. Les sondes subtélomériques pour les HSA18 (vert) et 21 (rouge) utilisées en 3.B montrent bien la translocation 21q au niveau distal du chromosome 18 (18p).

L'électrocardiogramme a montré une tétralogie de Fallot. La patiente présente en plus une dysplasie du rein droit, une scoliose, une hypotonie musculaire. L'analyse cytogénétique a été réalisée à la fois sur des lymphocytes du sang périphérique, et sur des fibroblastes de la peau. Le caryotype, ainsi qu'une analyse par FISH des lymphocytes ont révélé une T21. Les fibroblastes ont quant à eux montré un mosaïcisme. En effet, sur les 43 métaphases analysées, 31 ont montré une T21 avec un isochromosome 21 (46,XX,i(21)(q10)) alors que les 12 autres métaphases n'avaient qu'un seul chromosome 21 (45,XX,-21). Les caryotypes des parents étaient normaux. Ces résultats montrent l'importance de l'analyse de tissus autres que le sang si le caryotype des cellules sanguines ne correspond pas au phénotype observé. Par ailleurs, l'analyse avec des marqueurs microsatellite montre que le chromosome présent dans les cellules trisomiques est un isochromosome et non le produit d'une translocation Robertsonienne. Théoriquement, la formation d'un isochromosome peut avoir lieu après la formation du zygote ou durant la méiose. Chez cette patiente, la perte de la lignée de cellules 46,XX indique que l'isochromosome s'est formé soit à la première mitose, produisant une lignée de cellules trisomique et monosomique pour 21q avec la perte de la lignée monosomique dans certains tissus. Soit, cet isochromosome a pu se former lors de la méiose paternelle conduisant à une T21 initiale puis à une correction post zygotique par la perte de l'isochromosome ayant pour conséquence la formation de la lignée cellulaire monosomique.

3. Hétérogénéité de la Monosomie 21

A partir de l'analyse de patients atteints de monosomies 21 partielles (monosomie 21q22), une liste des phénotypes rencontrés et leur fréquence d'apparition a été établie et sert de référence pour le diagnostic de la M21 (*Table 1*).

En ce qui concerne essentiellement les signes dysmorphiques de la face, le retard mental et les capacités non intellectuelles, il a été rapporté une grande variabilité entre les patients atteints de M21 (Falik-Borenstein *et al.* 1992; Chettouh *et al.* 1995). De plus le phénotype varie en fonction de la région perdue, mais aussi en fonction du sexe du patient (Valero *et al.* 1999).

Falik-Borenstein et coll. décrivent en 1992 une étude familiale regroupant 4 individus (la fille, la mère, la grand-mère et le grand-oncle) soumis à la perte de la même partie 21q22.3 du HSA21, définie par les gènes *COL6A2*, *S100B* et *D21S44*. Alors que la mère apparaît normale exceptée pour une microcéphalie, la fille présente une microcéphalie, un retard de croissance et des problèmes comportementaux sévères.

Certains individus atteints de M21 partielle ne présentent pas de troubles cliniques autres qu'une stérilité ou une azoospermie (Alkhalaf *et al.* 2002) et d'autres expriment un retard mental, une microcéphalie... (Falik-Borenstein *et al.* 1992), ceci dépend essentiellement de la région concernée. De plus, le degré élevé de variabilité phénotypique chez des patients porteurs de délétions similaires, rend difficile d'établir l'influence phénotypique d'un allèle récessif ou dominant chez les individus hémizygotes (Valéro *et al.* 1999). Enfin, chez les individus porteurs d'une aneuploïdie partielle, la structure chromosomique est altérée et les effets de position doivent être pris en compte, particulièrement pour des gènes situés à proximité du télomère ou du centromère (Korenberg *et al.* 1994).

4. Les relations génotypes-phénotypes

Le développement des nouvelles techniques de liaisons génétiques et/ou d'hybridations *in situ* réalisées chez des patients tout d'abord identifiés comme des cas de M21 complète, ont permis de mettre en évidence une translocation d'un segment du HSA21

vers un autre chromosome. La mise en évidence de ces M21 partielles montre que le phénotype correspondant dépend du fragment de chromosome 21 perdu. Quelques études ont été menées afin d'établir des corrélations entre le génotype et le phénotype observé (Epstein 1990).

En 1995, Chettouh *et al.* ont réalisé une étude sur six patients atteints de M21 partielles. Les corrélations génotype-phénotype réalisées sur ces patients suggèrent que des régions chromosomiques définies contribuent à certains phénotypes. Par exemple, la délétion de la région *APP-SOD1* équivalente à une perte de 6,7 Mb, contribue fortement à l'apparition de 10 des 23 phénotypes de M21 (*Figure 4*). L'hypertonie et le retard mental sont des traits cliniques présents chez ces patients et font partie des symptômes les plus fréquemment observés (Chettouh *et al.* 1995).

Traits phénotypiques de la Monosomie 21	Fréquence	Traits phénotypiques de la Monosomie 21	Fréquence
Hypertelorisme	Très fréquent	Hypertonie / rigidité / spasticité	Fréquent
Microcéphalie	Très fréquent	Hypotonie	Fréquent
Nez long / gros / en bulbe	Très fréquent	Lèvres minces / rétractées	Fréquent
Orteils en marteau, autre que le gros orteil	Très fréquent	Lobe charnu	Fréquent
Petite taille	Très fréquent	Méga-uretère / hydronéphrose	Fréquent
Rétrognathisme / micrognathisme	Très fréquent	Microphthalmie	Fréquent
Ambiguïté sexuelle	Fréquent	Mort né / mort néonatale	Fréquent
Anomalie de la face/dysmorphie faciale	Fréquent	Narines antéversées	Fréquent
Anomalie du coude (autre que luxation)	Fréquent	Nez large / arête nasale large	Fréquent
Anthélix proéminent	Fréquent	Oreille grande / longue / large	Fréquent
Aréflexie / hyporéflexie	Fréquent	Oreilles basses implantées	Fréquent
Blépharophimosis	Fréquent	Oreilles en rotation postérieure	Fréquent
Chevauchement des doigts	Fréquent	Ostéoporose	Fréquent
Cheveux bas implantés sur la nuque	Fréquent	Philtrum long	Fréquent
Dermatoglyphes anormaux	Fréquent	Pied bot varus / valgus	Fréquent
Doigts phalange distale large / déviée	Fréquent	Poignet / carpe anomalie	Fréquent
Face asymétrique (pas de paralysie faciale)	Fréquent	Polykystose rénale	Fréquent
Fente palatine	Fréquent	Ptosis	Fréquent
Fente palpébrale anti-mongoloïde	Fréquent	Racine de l'hélix anomalie / crux cymbae	Fréquent
Fentes palpébrales larges	Fréquent	Racine du nez déprimée	Fréquent
Front étroit / rétraction temporale	Fréquent	Raideur articulaire	Fréquent
Front bas	Fréquent	Retard mental / psychomoteur	Fréquent
Front fuyant	Fréquent	Sourcils fournis / épais	Fréquent
Front haut	Fréquent	Strabisme	Fréquent
Hirsutisme	Fréquent	Synophris	Fréquent

Table 1 : Traits phénotypiques associés à la monosomie 21 partielle (délétion 21q22) et leur fréquence d'apparition (données obtenues sur le site www.orpha.net).

La région *APP-SOD1* contient notamment le gène *GLUR5* qui est exprimé dans les systèmes nerveux central et périphérique, pendant le développement et au stade adulte (Kawahara *et al.* 2003). Ces données suggèrent fortement l'implication du gène *GLUR5* dans la formation et le

fonctionnement d'un grand nombre de circuits neuronaux. C'est pourquoi, ce gène pourrait jouer un rôle délétère dans le retard mental, et probablement dans l'hypertonie. La délétion de gènes distaux au gène *SOD1* contribuerait également au retard mental (Chettouh *et al.* 1995).

En 1997, Orti *et al.* ont établi une carte physique de la région située entre les gènes *APP* et *SOD1*, initialement caractérisée. Les auteurs ont restreint l'intervalle de la région critique à 2,3 Mb, comprise entre les marqueurs *D21S190* et *D21S226*. La délétion de cette région, dénommée M21CR1 ("Monosomy 21 Chromosome Region 1"), serait à l'origine de certaines caractéristiques de la M21 telles que les malformations du visage, le nez court, un pli palmaire transverse et le retard mental.

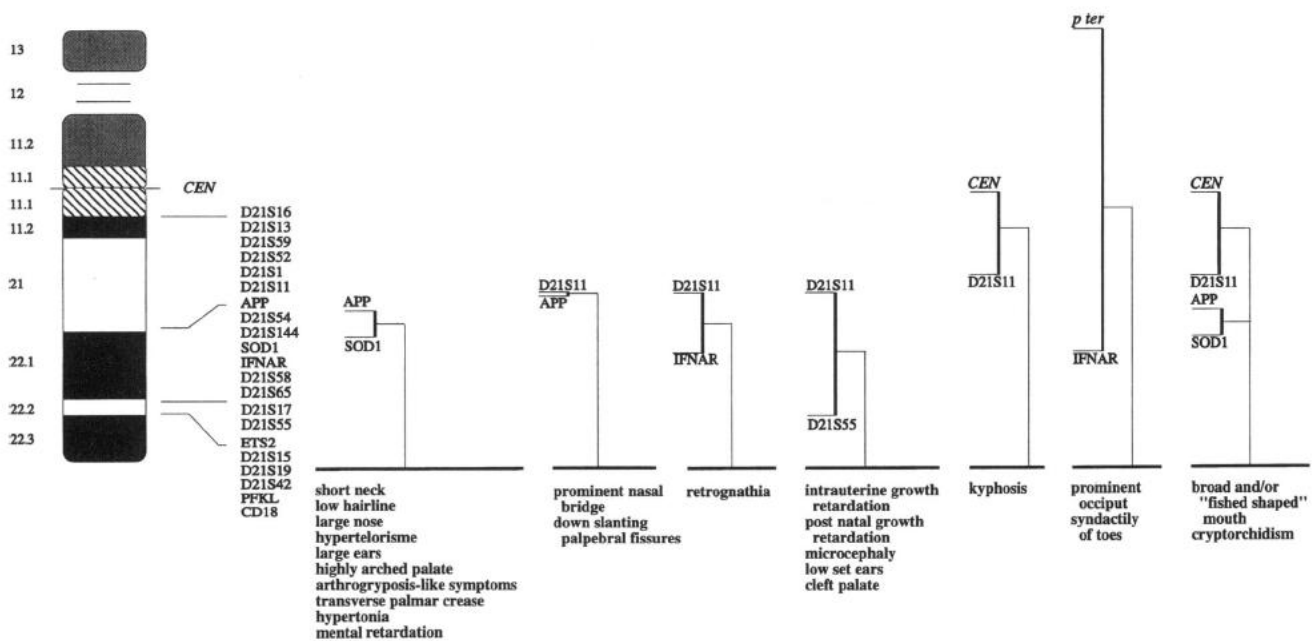


Figure 4: Carte phénotypique assignant 23 caractères de monosomie 21 partielle à différentes régions du HSA21 (tiré de Chettouh *et al.* 1995).

D'autres études ont porté sur les conséquences phénotypiques d'une délétion de la région télomérique du HSA21. Chez trois patients atteints de trisomie 21 (T21), des analyses du caryotype ont confirmé la présence d'une duplication reverse en tandem de la région dont les bornes sont définies par le gène *SOD1* et le gène le plus distal *CD18* (21q22.1-21q22.3).

D'autres études ont révélé chez ces mêmes patients une délétion partielle de la région télomérique allant du gène le plus proximal *PFKL* au gène le plus distal *S100B*, dont les points de cassure de la translocation sont différents dans chacun des cas (Pangalos *et al.* 1992). Les analyses cytogénétiques confirment chez tous les patients une duplication des marqueurs *SOD1*, *S15* et *S42* et une délétion des gènes *COL6A1* à *S100B*. Les résultats n'indiquent pas de différence significative entre les phénotypes de ces trois patients et ceux observés chez des individus porteurs d'une trisomie complète. De plus, aucun des trois patients considérés ne présente de phénotype associé à la M21 sauf un seul patient avec des oreilles larges (Pangalos *et al.* 1992). De ce fait, les auteurs en concluent que les gènes contenus dans la région 21q22.3 la plus télomérique (1.5 à 3 Mb) n'ont pas d'incidence dans l'apparition des phénotypes liés à la M21.

Toutefois, une étude plus récente de Valero *et coll.* décrit huit patients dont trois sont atteints de M21, et met en évidence une implication de la région 21q22.3 la plus distale dans l'expression phénotypique de la M21. Ainsi, le patient CGM-14 a subi une perte d'un fragment de la région 21q22.3 du HSA21 entre les marqueurs les plus télomériques *D21S1411* et *D21S1446*. Ses symptômes cliniques sont une hypoplasie, une absence du 5^{ème} doigt, des anomalies de son électroencéphalogramme et une atrophie cérébrale subcorticale étendue (Valero *et al.* 1999).

Enfin, le gène *DYRK1A* est un candidat de microcéphalie puisqu'il se situe sur le segment chromosomique minimal absent dans les M21 associées à une microcéphalie, un retard de croissance intra-utérin, et des oreilles basses (Guimera *et al.* 1999).

D. Les similitudes des phénotypes dans la Monosomie et la Trisomie 21 et la contribution allélique

Il est intéressant de constater que beaucoup de signes cliniques associés à la M21, tels que la microcéphalie, le cou court, le pont nasal aplati, une anomalie de la formation et de l'implantation des oreilles et le pli palmaire transverse (Chettouh *et al.* 1995) sont aussi présents chez les patients atteints de T21.

Cette concordance favorise l'hypothèse selon laquelle l'excès ou le déficit de dose génique peut produire des phénotypes similaires (Valero *et al.* 1999). Selon la « force » respective des allèles l'effet de dose allélique peut avoir des conséquences différentes. Ainsi, si un allèle « A » est semi-dominant par rapport à un allèle récessif « a », les patients monosomiques « A0 » auront un phénotype identique à un individu trisomiques « Aaa ». De même si l'allèle « a » est un récessif par rapport à un allèle sauvage A, le phénotype « a0 » sera équivalent aux combinaisons « aa » et « aaa » alors que Aa sera équivalent à AA ou Aaa ou AaA.

E. La Trisomie 21 (T21) ou syndrome de Down (SD)

La trisomie 21, syndrome congénital associé à la présence de 3 copies de la totalité ou d'une partie du chromosome 21, est le type d'aneuploïdie le plus courant chez l'homme.

Les premières descriptions de ce syndrome remontent au 19^{ème} siècle, avec en 1846, le docteur Edouard Séguin qui décrit pour la première fois le visage très caractéristique des individus trisomiques. En 1866, le docteur John Langdon Haydon Down fait une description détaillée des personnes trisomiques présentant plusieurs anomalies d'où le nom de syndrome de Down également employé pour désigner la trisomie 21. C'est à lui qu'on doit aussi le terme de "mongol" car il a comparé le faciès des trisomiques à celui du peuple de Mongolie, terminologie abandonnée suite aux plaintes justifiées du peuple de Mongolie. L'origine chromosomique n'a été mise en évidence qu'en 1959, par le Professeur Jérôme Lejeune et son équipe qui rendaient compte de leur découverte à l'Académie des Sciences à savoir l'existence d'un troisième chromosome sur la 21^{ème} paire chromosomique (Lejeune *et al.* 1959).

1. Caractéristiques cytogénétiques

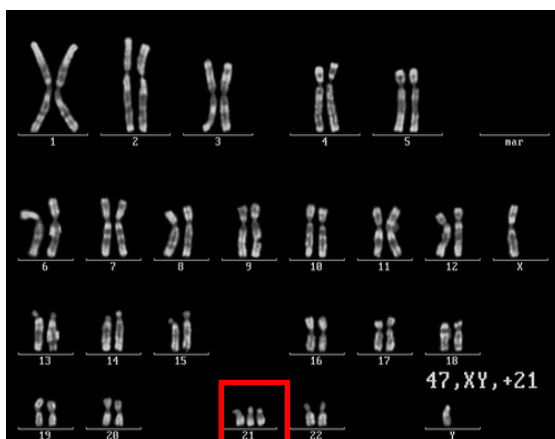
Il existe différents types de Trisomie 21 qui peuvent être classés en trois grandes catégories:

i. Trisomie 21 libre : homogène et en mosaïque

La T21 libre ou complète est la plus fréquente (92 à 95 %). Elle est d'origine maternelle dans la majorité des cas avec une non disjonction en méiose I. Quand elle est d'origine paternelle (de 2 à 5% des cas), la non-disjonction a essentiellement lieu en méiose II (*Figure 5*).

Elle est dite homogène, quand le caryotype de toutes les cellules comporte 47 chromosomes dont 3 chromosomes 21. Elle est qualifiée de mosaïque (2 à 4% des cas), quand certaines cellules de l'organisme ont un caryotype normal et d'autres trisomiques. Dans ce cas, la non-disjonction a lieu après fécondation, lors des divisions somatiques de l'œuf (mitose), alors que dans les deux cas précédents l'anomalie avait lieu pendant la formation des ovules ou des spermatozoïdes. Les effets cliniques du mosaïsme sont variables puisque cela dépend de son degré (pourcentage de cellules trisomiques) et des tissus ou organes impliqués (contenant cette lignée de cellules trisomiques), mais ces individus sont moins atteints que les autres.

A



B

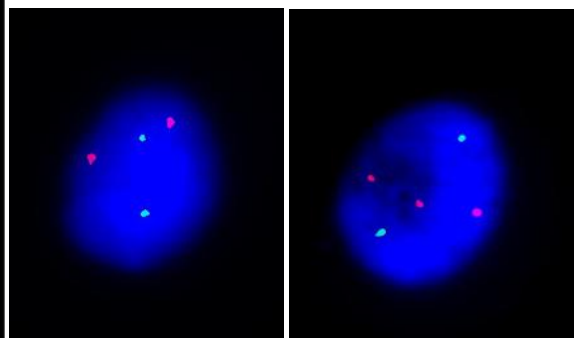


Figure 5: Visualisation d'un chromosome 21 surnuméraire par un caryotype (A). La technique de Fluorescence par Hybridation In Situ (FISH) utilise des sondes fluorescentes complémentaires des chromosomes cibles. La sonde verte est associée à la paire de chromosome contrôle et la rouge au HSA21. Les deux points rouges en B sont caractéristiques d'un individu sain (à gauche) et d'un patient trisomique (à droite).

ii. Trisomie 21 par translocation

Elle s'observe dans 3 à 5 % des cas. Elle consiste en la fixation de tout ou d'une partie d'un chromosome 21 sur un autre chromosome le plus fréquemment acrocentrique comme le

13 ou le 14. Il s'agit en général d'une translocation de plus de 5 Mb. Elle peut apparaître spontanément au cours de la fécondation ou bien, elle peut déjà exister chez l'un des parents ; dans ce cas elle est dite équilibrée chez le parent qui a une apparence et un capital chromosomique normal. Ces translocations peuvent être familiales ou sporadiques d'où la nécessité absolue de faire l'étude du caryotype des parents.

iii. Trisomie 21 partielle :

Ce type de trisomie est plus rare, et provient d'un accident génétique ou d'un remaniement chromosomique équilibré chez un des parents, c'est-à-dire que seule une partie du HSA21 est en excédent. La personne porteuse d'une trisomie 21 partielle ne présentera que certains signes de trisomie, ces signes dépendant du fragment en excès.

La récurrence familiale de la trisomie 21 demeure une éventualité exceptionnelle, après avoir éliminé les translocations et les mosaïques parentales.

2. Les facteurs de risques

La trisomie 21 est la plus fréquente des aneuploïdies rencontrées chez l'homme. Même si elle conduit dans 50% des cas à un avortement spontané, elle touche encore 1 naissance sur 700. Néanmoins, différents facteurs peuvent faire varier le risque de trisomie :

- la taille du segment transloqué : plus le segment est petit, plus la viabilité est grande.
- le sexe du parent porteur : la non disjonction est dans environ 94 % des cas d'origine maternelle et dans 6 % des cas d'origine paternelle (Antonarakis *et al.* 1991 ; Sherman *et al.* 1991). Par ailleurs, l'âge maternel est un facteur déterminant la fréquence de cette maladie et, il reste le seul facteur de risque reconnu aujourd'hui. Différentes études ont systématiquement montré que le risque de mettre au monde un enfant trisomique augmentait avec l'âge de la mère (Cuckle HS *et al.* 1987 ; Hook *et al.* 1981). Dans plus de 93% des cas de trisomies 21 libres, le chromosome 21 surnuméraire est apporté par la mère, ce risque augmentant de façon exponentielle avec l'âge maternel. Le retard de la première maternité dans nos sociétés occidentales font de la T21 un réel enjeu de santé publique, alors que dans les pays en voie de développement, l'accès au suivi de la grossesse reste à mettre en place.

3. Les signes cliniques

Ce syndrome complexe se manifeste lors du développement embryonnaire. Il touche de nombreuses fonctions biologiques et conduit à l'apparition de traits phénotypiques variés (*Table 2*).

Lorsqu'il est proposé, le diagnostic prénatal comporte deux aspects. Le premier, sont les signes d'appel échographiques. Il regroupe les anomalies du développement et les malformations spécifiques de la T21, actuellement détectables à l'échographie. Parmi ces manifestations, un signe majeur est représenté par l'augmentation de la clarté nucale. Cependant, ce critère pouvant disparaître vers 15 semaines d'aménorrhée (SA), sa recherche est imposée entre 11 et 12 SA. Le second aspect du diagnostic prénatal comporte le dosage des marqueurs sériques maternels, effectué vers la 16 SA. Deux marqueurs au moins doivent être analysés. La diminution de l'alpha-foeto-protéines et de l'oestriol non conjugué sont des signes de T21, alors que dans ce cas la β -hCG augmente. Le dosage est proposé lorsque le risque (taux des marqueurs couplé à l'âge de la mère) est $\geq$ à 1/250. Toutefois, avec ce risque seules 2/3 des T21 seront dépistées.

Les patients vont tous présenter un retard mental dont la pénétrance est variable d'un individu à l'autre, ainsi qu'une hypotonie. D'autres signes cliniques vont caractériser le SD : l'apparition d'une forme précoce de la maladie d'Alzheimer (après 40 ans), une brachycéphalie, une petite stature, un épicanthus (repli de l'angle cutané interne des paupières), des tâches de Brushfield, une protrusion de la langue due à une petite mâchoire, des oreilles basses et des problèmes d'audition. Ils vont également développer des anomalies cardiaques, intestinales (Dierssen *et al.* 2001), immunitaires, thyroïdiennes, osseuses (Pueschel S.M. 1990) et de la reproduction (Egozcue *et al.* 2000).

La trisomie 21 est un facteur de risque significatif pour la maladie de Hirschsprung, les maladies congénitales du cœur, la surdité et beaucoup d'autres anomalies liées au SD. C'est également un facteur de risque important de la leucémie infantile et de l'épilepsie (Hitzler J.K. et Zipursky A. 2005, Alderton *et al.* 2006).

i. Les anomalies cognitives

La principale caractéristique des patients avec le SD est le retard mental, couplé à des troubles du langage et du comportement d'adaptation. Le SD est la cause la plus fréquente de débilité mentale congénitale. Il est important de noter que le retard mental évolue chez les patients et s'accompagne souvent d'atteintes psychologiques et s'accroît avec l'âge.

Le développement psychomoteur est ralenti dans son ensemble, les fonctions intellectuelles sont globalement atteintes avec dégression des facultés d'abstraction. Différentes études d'imagerie ont mis en évidence des anomalies neuroanatomiques dans le cortex cérébrale (Pinter *et al.* 2001; Gokcora *et al.* 1999), dans l'hippocampe (Aylward *et al.* 1999) d'individus avec le SD. Le quotient intellectuel (QI) dépasse rarement 70 soit l'âge d'un enfant de 8-10 ans.

Par ailleurs, les patients T21 peuvent présenter des problèmes psychiatriques et/ou comportementaux, allant d'un simple déficit d'attention à une hyperactivité (6.1 %) ou une conduite agressive (6.5 %). 25.6 % d'adultes avec le SD ont un désordre psychiatrique, le plus souvent une dépression importante ou un comportement agressif.

ii. Les anomalies morphologiques

Les dysmorphies faciales constituent entre autre, un phénotype physique distinctif, présent chez tous les patients T21. En effet, ces patients sont caractérisés notamment par un crâne rond, un occiput plat, une face aplatie avec un nez court, retroussé, aplati à la racine et des petites narines orientées vers l'avant. Ils possèdent également un faciès rond, une nuque plate et un cou court et large avec un excès de peau. Les oreilles ont une implantation basse, un pavillon rabattu vers l'avant. Un autre signe caractéristique est une petite bouche ouverte en permanence, avec des lèvres épaisses et fendillées.

Signes cliniques	Fréquence d'apparition	Signes cliniques	Fréquence d'apparition
Brachycéphalie/occiput plat	Très fréquent	Microdontie totale ou partielle	Fréquent
Cou court	Très fréquent	Microstomie / petite bouche	Fréquent
Épicanthus	Très fréquent	Nez court / nez petit	Fréquent
Excès de peau dans le cou	Très fréquent	Nez plat	Fréquent
Face plate	Très fréquent	Obésité généralisée	Fréquent
Fente palpébrale mongoloïde	Très fréquent	Palais ogival / étroit	Fréquent
Hyperlaxité ligamentaire	Très fréquent	Pli palmaire transverse	Fréquent
Hypotonie	Très fréquent	Régression psychique / démence	Fréquent
Mains courtes / brachydactylie	Très fréquent	Sénilité précoce / vieillissement prématuré	Fréquent
Oreille ronde	Très fréquent	Stérilité / hypofertilité	Fréquent
Pied court / brachydactylie	Très fréquent	Susceptibilité aux infections	Fréquent
Racine du nez déprimée	Très fréquent	Anomalies de l'intestin grêle / colon	Occasionnel
Retard mental / psychomoteur	Très fréquent	Cataracte	Occasionnel
Anomalie de la dentition	Fréquent	Hyperglycémie / diabète non insulino dépendant	Occasionnel
Anomalie du système lymphatique-immunitaire	Fréquent	Hypothyroïdie	Occasionnel
Bouche entrouverte en permanence	Fréquent	Hypotrichie localisée	Occasionnel
Cardiopathie congénitale	Fréquent	Imperforation anale / fistule recto-vagin.	Occasionnel
Clinodactylie du 5 ^{ème} doigt	Fréquent	Insensibilité douleur / troubles sensitifs	Occasionnel
Coins de la bouche tombants	Fréquent	Leucémie	Occasionnel
Espace entre 1 ^{er} et 2 ^{ème} orteil	Fréquent	Myopie	Occasionnel
Fontanelle:large / retard de fermeture	Fréquent	Rein agénésie / hypoplasie uni/bilatérale	Occasionnel
Hernie ombilicale	Fréquent	Strabisme	Occasionnel
Lèvres épaisses	Fréquent	Surdité de transmission / conduction	Occasionnel
Macroglossie	Fréquent	Troubles de la marche / démarche anormale	Occasionnel

Table 2: Signes cliniques rencontrés dans la trisomie 21 et leur fréquence d'apparition.

Adapté du site Orphanet:

http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=FR&Expert=870

Les dysmorphies du tronc et des membres sont aussi caractéristiques de la T21. Ces patients sont plus petits que la population normale. Les membres, de façon générale, tant au niveau des membres supérieurs qu'inférieurs, sont plus courts et cela surtout aux extrémités : au niveau des mains, elles sont trapues, courtes et présentent dans 75 % des cas un pli palmaire transverse unique. Les doigts sont courts. Le pouce est implanté de façon basse et l'auriculaire présente une brachymésophalangie et une clinodactylie. Les jeunes enfants atteints par le SD présentent des déficits sévères de préhension des objets (Kearney K. et Gentile 2003). Le pied est court et carré avec un espace plus grand entre le gros orteil et le deuxième orteil et un sillon vertical à ce niveau.

Dès la naissance, les nouveaux-nés trisomiques 21 ont une hypotonie axiale et périphérique très marquée avec une hyperlaxité ligamentaire. Cette hypotonie musculaire est

importante dès la naissance et entraîne des retards d'acquisition de la tenue de tête (6 mois), de la station assise (1 an) et de la marche (2 ans). Ces patients présentent des malformations du squelette telles que des anomalies de l'angulation des ailes iliaques (Freed *et al.* 2000), des malformations des premières vertèbres cervicales (Pueschel 1990), des scolioses malformatives et des pieds bot varus équins.

Il est important de noter que la majorité de ces phénotypes, ainsi que le retard mental se retrouvent fréquemment dans la M21.

iii. Les anomalies cardiaques

Les cardiopathies concernent 50 % des nouveaux-nés T21 et sont la principale cause de mortalité dans les deux premières années de la vie et *in utero*. A l'inverse, 70 % des personnes présentant des défauts cardiaques sont également atteintes du SD (Barlow *et al.* 2001). Dans la population générale leur incidence n'est que de 0,8 %.

La plus fréquente des cardiopathies, correspond à un canal atrio-ventriculaire (CAV) unique dans 60 % des cas, qui s'accompagne notamment, d'un défaut septal atrioventriculaire et d'un défaut septal atrial (Barlow *et al.* 2001). Cette malformation se traduit par des communications anormales à travers le septum auriculaire et le septum ventriculaire. De plus, un orifice entre le ventricule et l'oreillette du même côté est présent: défaut des valvules tricuspide et mitrale.

Plus rarement, ces patients présentent une tétralogie de Fallot ou encore un ventricule droit à double issue. Ces malformations cardiaques restent la cause principale de mortalité des sujets trisomiques (Wessels *et al.* 2003) mais peuvent être détectées très tôt par échographie néonatale.

iv. Les anomalies gastro-intestinales

Parmi les individus atteints de SD, 12% présentent des malformations congénitales au niveau du tractus gastro-intestinal, incluant une fistule trachéo-oesophagienne, des reflux oesophagiens, une sténose du pylore, une sténose ou une atrésie duodénale, un pancréas annulaire, une atrésie anale, des imperforations anales. La T21 est également un facteur de

risque important pour la maladie de Hirschsprung (1/30 individus T21) incluant constipation, obstruction intestinale et perforation du côlon (Badner *et al.* 1990).

v. Les troubles sensoriels

Entre 38 et 78% des personnes porteuses de la T21 ont des problèmes d'audition qui peuvent être de conduction, neurosensoriel ou les deux (Roizen N.J. et Patterson D. 2003). Pour pallier à ces défauts le langage des signes peut être utilisé ainsi que les prothèses auditives et les implants cochléaires.

Par ailleurs, les patients T21 présentent aussi de nombreuses anomalies oculaires dont la fréquence augmente avec l'âge ; environ 38% des enfants de moins d'un an et 80% des 5-12 ans, présentent des désordres qui doivent être surveillés tels que cataractes congénitales et glaucome (Roizen N.J. et Patterson D. 2003).

Les principales atteintes observées sont des problèmes de réfraction (35-76%), des strabismes (27-57%) et des nystagmus (20%). Le kératocône (déformation évolutive de la cornée) touche également 5 à 8% des trisomiques. Les taches de Brushfield, petites lésions jaunâtres à la surface de l'iris, se voient surtout sur des iris clairs et sont sans conséquence fonctionnelle.

En 2002, Frederikse P.H. et Ren X.O. montrent une association entre la surexpression du gène *APP* (Amyloid Precursor Protein) localisé sur le chromosome 21 et une cataracte précoce dans un modèle de souris transgénique pour le gène codant l'APP humaine normale. Des mutations dans le gène *CRYAA* localisé dans la région 21q22.3 homologue au MMU17 sont également à l'origine de cataractes congénitales (Hsu *et al.* 2006; Mackay *et al.* 2003).

vi. Les anomalies pulmonaires

Les patients SD peuvent présenter une variété d'anomalies pulmonaires, comme par exemple une structure anormale de la vascularisation pulmonaire, des lésions cystiques du poumon. Ces malformations sont fréquemment associées à l'hypertension pulmonaire, et peuvent être, ou non associées à des défauts cardiaques tel que le défaut du septum atrio-ventriculaire (AVSD) (Frescura *et al.* 1987, Suzuki *et al.* 2000, Schloo *et al.* 1991, Shah *et al.* 2004). Cependant, Clapp *et al.* (1990) montrent que les patients SD avec un défaut complet du

septum atrio-ventriculaire sont plus susceptibles de développer une résistance vasculaire pulmonaire durant la première année de vie, ainsi qu'une progression rapide vers une obstruction vasculaire pulmonaire, que les patients sans SD.

En 2005, Shehata *et al.* rapportent le cas d'un nouveau né trisomique 21 décédé à trois mois d'hypertension pulmonaire causée par une dysplasie capillaire alvéolaire avec un défaut d'alignement des veines capillaires (DAC). La DAC est une anomalie rare de la structure du poumon associée à l'hypertension pulmonaire et à l'hypoxémie (diminution de la quantité d'oxygène transportée dans le sang) qui cause une détresse respiratoire conduisant au décès dans les premières semaines de vie. L'enfant a été intubé dès la naissance et un électrocardiogramme a montré un DSAV. De plus il présentait des signes morphologiques de T21 qui ont été confirmés par caryotype. Dans les premières semaines, le nouveau-né a développé une effusion pleurale, une hypoxémie et une acidose ainsi qu'une hypertension pulmonaire et une hypotension systémique. Durant les dernières semaines, une septicémie s'est développée et un dysfonctionnement de nombreux organes a conduit au décès.

Plus récemment (Barth *et al.* 2009) le cas d'un patient T21 présentant une hypertension artérielle pulmonaire sévère associée à un DSAV a été décrit. Le patient trisomique a été diagnostiqué à l'âge de 6 mois pour un DSAV associée au syndrome d'Eisenmenger. Ce syndrome désigne l'ensemble des symptômes traduisant l'existence d'une hypertension artérielle pulmonaire dite « fixée », qui complique l'évolution spontanée de la cardiopathie existante. Le shunt gauche-droit est responsable d'une augmentation importante et prolongée du débit sanguin dans la circulation pulmonaire. Cet excès de sang au niveau des poumons peut provoquer un œdème pulmonaire ainsi qu'une insuffisance ventriculaire gauche. La résistance pulmonaire n'a pas été jugée opérable, mais le pronostic vital n'était pas engagé. Durant l'enfance, le patient a développé des complications respiratoires ainsi qu'une cyanose modérée. A l'âge de 22 ans, le statut fonctionnel du patient s'est fortement détérioré, avec une forte dyspnée (essoufflement), des infections pulmonaires récurrentes dues à une hypoxémie ainsi qu'à une érythrocytose (augmentation du nombre total d'hématies). Entre 22 et 24 ans, le patient a été pris en charge médicalement afin de ré-évaluer les paramètres hémodynamiques. La saturation en oxygène est passée de 80 à 75% et le diagnostic a confirmé une obstruction pulmonaire sévère ainsi qu'une sténose (rétrécissement) valvulaire.

Finalement, le patient a subi une chirurgie corrective et un an après le patient était asymptomatique. Il s'agit ici du premier cas décrit de correction de l'hypertension artérielle pulmonaire chez un patient T21.

4. Les désordres biochimiques

i. Les troubles du métabolisme

Les individus trisomiques présentent différents désordres métaboliques dus aux gènes du HSA21 codant pour des enzymes clés du métabolisme comme la PhosphoFructoKinase (PFK) (Annerén *et al.* 1987) ou la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase qui est augmentée dans le cerveau d'individus atteints du SD mais pas dans celui de patients présentant la maladie d'Alzheimer qui ont un niveau similaire aux contrôles (Lubec *et al.* 1999).

ii. Les troubles hématologiques

Les individus porteurs de la T21 sont plus susceptibles de présenter des anomalies d'ordre hématologique. On retrouve une polyglobulie dans 64% des cas, une macrocytose dans 66%, une anomalie myéloproliférative transitoire, aiguë ainsi qu'une leucémie lymphoblastique aiguë (Roizen N.J. et Patterson D. 2003).

iii. Les anomalies du système immunitaire

Le système immunitaire de la personne trisomique présente des déficits et des particularités, ces patients sont notamment très sensibles aux infections et d'autant plus à des affections de la sphère ORL.

Il est connu que chez les patients SD le développement et la fonctionnalité du thymus sont incorrects. Murphy *et al.* (1992) ont montré que chez les patients, il y a une dérégulation de l'expression de l'IFN- γ et du TNF- α , qui sont des cytokines nécessaires au développement correct du thymus.

Par ailleurs, l'étude de Cossarizza *et al.* (1991) confirme que chez les enfants T21 le nombre de lymphocyte T CD4⁺ (lymphocytes nouvellement synthétisés) est fortement réduit

alors que le nombre de des CD8+ augmente (Lymphocytes T mémoires), avec une inversion du rapport CD4/CD8). De plus, le nombre de lymphocytes T cytotoxiques (activité Natural Killer) augmente alors qu'ils montrent une activité cytotoxique fortement diminuée.

Enfin, le défaut d'activation des lymphocytes T pourrait dépendre d'un affaiblissement partiel de la transduction du signal après l'activation du complexe TCR/CD3 (Franciotta *et al.* 2006, Scotese *et al.* 1998).

5. Les pathologies associées

i. L'obésité

En 1992, Bell et Bhate ont évalué l'indice de masse corporelle (IMC) de 58 adultes T21 et l'ont comparé à un groupe d'adultes contrôles. Les auteurs ont constaté que la proportion d'adultes en surpoids était excessive parmi ces patients comparés aux adultes ayant un autre type de retard mental et que cette proportion était supérieure chez les femmes. Dans une étude récente, les patients T21 sont comparés deux à deux avec des patients présentant un autre type de retard mental. Ces auteurs montrent ainsi, une incidence plus élevée de l'obésité chez les femmes trisomiques par rapport aux femmes atteintes d'autres retards mentaux, les résultats chez les hommes ne montrent pas d'association entre surpoids et trisomie 21 (Melville *et al.* 2005).

ii. Le diabète

Le diabète a une plus forte incidence chez les trisomiques 21 que dans la population générale. Chez les jeunes patients atteints plus précocement que les sujets normaux, 2% des moins de 14 ans sont diabétiques contre 0,1% dans la population non atteinte. L'étude de Shield et collaborateurs montre que le diabète de type 1 (auto-immun) est quatre fois plus fréquent chez des enfants T21 (Shield *et al.* 1999). Le diabète de type 2 (résistance à l'insuline) est moins référencé. L'étude de Iwasaki et collaborateurs montre un lien entre le diabète de type 2 et des marqueurs génétiques (microsatellites) localisés sur différents autosomes. Cette étude sur une population de 622 sujets d'origine japonaise dont 256 sont T21 montre un lien entre la région 21q22.2 et le phénotype diabétique de type 2 (Iwasaki *et al.* 2003).

iii. Les cancers et tumeurs solides

Les cancers dans la population trisomique 21 sont aussi fréquents que dans la population générale mais leur répartition est différente.

Les leucémies du jeune enfant sont beaucoup plus fréquentes alors que les cancers solides chez l'enfant et l'adulte le sont beaucoup moins que dans la population générale (Hasle *et al.* 2000 ; Hitzler *et al.* 2005 ; Sullivan *et al.* 2007). Chez ces patients, certains tissus semblent plus touchés, comme les cellules sanguines et les cellules sexuelles ; alors que d'autres comme le tissu nerveux ou les tissus épithéliaux le sont beaucoup moins que dans la population générale (Satge *et al.* 1998).

iv. Les leucémies

Le SD augmente le risque de leucémie de 10 à 20 fois. Les leucémies sont majoritairement des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) ou des leucémies myéloïdes aiguës (LAM) et plus précisément un sous-type la leucémie aiguë mégacaryocytaire (LAM7).

Alors que la leucémie aiguë lymphoblastique est la plus fréquente des leucémies chez l'enfant, les enfants avec un syndrome de Down ont un risque 500 fois plus élevé de leucémie aiguë myéloïde avec différenciation mégacaryocytaire (LAM7). Ce type de leucémie est dû à une anomalie de la différenciation des mégacaryocytes en plaquettes et donc à leur accumulation dans la moelle osseuse. Une leucémie transitoire (LT) peut être observée à la naissance, régresser spontanément ou évoluer dans 20% des cas vers une LAM7 dès l'âge de 4 ans.

Plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans la différenciation de ces cellules dont RUNX1, localisé sur le chromosome 21 (Hitzler *et al.* 2005 ; Yamagata *et al.* 2005). Ce gène est l'une des cibles les plus fréquentes des réarrangements chromosomiques à l'origine de leucémies humaines. Wechsler et coll. ont identifié la présence de mutations acquises du gène *GATA-1* chez 6 trisomiques atteints de leucémie mégacaryoblastique aiguë (AMKL) (Wechsler *et al.* 2002). Il faut noter que, dans 70 à 100 % des cas de patients trisomiques 21 atteints de leucémies, la chimiothérapie est efficace. Cette augmentation de la sensibilité aux drogues résulte certainement des déficiences métaboliques liées à la triplication du gène de la cystathionine β -synthase (CBS) dans la T21 (Ravindranath 2003 ; Gurbuxani *et al.* 2004).

v. La neuropathologie de type Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une pathologie neurodégénérative, décrite par Alois Alzheimer en 1906, caractérisée par des troubles de la mémoire, du langage, de la reconnaissance visuelle et de l'organisation des mouvements. Elle se caractérise du point de vue histologique par une dégénérescence neuronale ainsi que la présence, dans l'amygdale, l'hippocampe et la majorité du cortex cérébral, de deux types de lésions: les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires (Blennow *et al.* 2006).

Dans la population T21, des lésions cérébrales comparables à celles observées dans la maladie d'Alzheimer ont été observées dans les cerveaux de patients (Masters *et al.* 1985). Les similitudes de lésion cérébrale suggèrent que les voies pathogènes de la maladie d'Alzheimer et du syndrome de Down puissent être provoquées par le(s) même(s) gène(s). Les études de formes familiales d'Alzheimer avec micro-trisomie autour du gène *APP* révèlent que le surdosage d'APP provoque un effet délétère sur les cellules nerveuses par accumulation de peptide A β (Rovelet-Lecrux *et al.* 2006). Cependant, il semble que l'impact varie beaucoup selon les individus, car tous les patients T21 ne développent pas une pathologie de type Alzheimer. De plus, *APP* n'est pas le seul gène surexprimé, d'autres gènes contrôlant le catabolisme de la protéine, comme *BACE2*, sont aussi présents sur le HSA21.

vi. La sensibilité aux infections pulmonaires

Les infections pulmonaires et les complications cardiaques restent les premières causes de décès des patients T21.

En 1982, Balarajan *et al.* étudient les causes de décès dans une cohorte de 30 patients SD. Dix sont décédés d'une bronchopneumonie, sept de maladies liées à un défaut cardiaques et sept de causes diverses. Sept ans plus tard, une nouvelle étude est menée par Bell *et al.* sur 426 patients. 69 patients décèdent durant l'étude dont 41 d'anomalies cardiaques et 27 d'infections pulmonaires. Cependant, depuis la fin des années 80, les défauts cardiaques sont très fréquemment opérés ce qui explique que les décès dus aux défauts cardiaques congénitaux se placent derrière ceux survenant suite à une infection pulmonaire. De nos jours, la pneumonie et les autres infections respiratoires sont la première cause de décès chez les

patients, quel que soit leur âge. Néanmoins entre 19 et 40 ans, les patients décèdent aussi bien d'infections pulmonaires que de complications cardiaques (Bittles *et al.* 2006).

Cant *et al.* (1987) ont été les premiers à montrer une susceptibilité accrue des patients T21 à la trachéite bactérienne. Quatre enfants trisomiques infectés par *H. influenzae* ont été hospitalisés avec une forte fièvre, un stridor (bruit) respiratoire, une obstruction respiratoire sévère qui a nécessité une intubation, ainsi que des sécrétions purulentes abondantes. Ils ont été traités par antibiotiques et physiothérapie. Toutefois, si l'infection n'est pas détectée et traitée à temps, elle peut conduire à des complications sévères telles que l'arrêt cardio-respiratoire et la bronchopneumonie.

Par ailleurs, il existe un facteur de risque important entre le syndrome de Down et l'infection par le virus respiratoire syncytial (VRS). Cette pathologie est la plus importante cause de déficience des voies respiratoires inférieures chez l'enfant. Elle peut se compliquer et devenir une bronchiolite nécessitant l'hospitalisation de l'enfant. Dans 2/3 des cas on observe une forme récidivante qui peut évoluer vers une insuffisance respiratoire. Cette donnée a été validée par une étude sur 395 patients T21 dont 180 ont été infectés par le VRS et 39 hospitalisés pour des complications respiratoires (Bloemers 2007).

Cette sensibilité aux infections pulmonaires peut s'expliquer par différents facteurs. Il est courant, d'observer chez les personnes trisomiques une obstruction des voies aériennes supérieures causée par une hypertrophie de la langue, un amincissement de la média des artérioles pulmonaires, ainsi qu'une réduction du nombre d'alvéoles pulmonaires (Sungur *et al.* 2008).

Plus récemment, une augmentation du nombre de copies du gène de la Mannan-binding lectine (MBL) chez les patients T21 a été associée à leur susceptibilité aux infections. Ce gène code pour une protéine, essentiellement localisée dans le plasma, qui est capable d'éliminer les pathogène en facilitant la phagocytose. Une déficience en MBL est associée à l'immunodéficience, alors qu'une augmentation de cette protéine est associée à des maladies

inflammatoires chroniques. La concentration en MBL dans le sérum a été mesurée chez 104 patients qui ont présenté des infections récurrentes (n=46) ou non (n=104). Les patients ayant une forte diminution de MBL sérique (<100 ng/ml) sont plus sensibles aux infections pulmonaires, qu'elles soient récurrentes (n=16/46) ou non (n=14/46). Une forte augmentation (>1001 ng/ml) produit le même effet puisqu'elle est associée à une augmentation du nombre de patients présentant une infection récurrente (n=21/46) ou non (n=54/104) (Nisihara *et al.* 2010).

6. La variabilité phénotypique de la Trisomie 21

Les signes cliniques associés à la T21 ne sont pas présents chez tous les individus porteurs, à l'exception du retard mental et de l'hypotonie néonatale. De plus la pénétrance du phénotype est variable d'un patient à l'autre. Différents facteurs peuvent expliquer cette variabilité d'expression et de sévérité dans la manifestation de la T21 chez les patients. L'hétérogénéité allélique des gènes en trois copies, les interactions avec les autres chromosomes, l'empreinte génétique parentale et l'effet de l'environnement pré et post-natal peuvent être des explications à cette variabilité (Korenberg *et al.* 1994).

Enfin, il est important de rappeler que la majorité de ces phénotypes, ainsi que le retard mental apparaissent de façon systématique à la fois chez les patients T21 et M21, mais que peu d'études phénotypiques ont été publiées sur les patients M21.

7. Les corrélations génotype-phénotypes

Tandis que la majorité des cas de SD sont associés à une T21 complète, l'occurrence de cas de T21 partielles associées au SD suscite l'espoir de trouver une région critique du SD (DCR). L'analyse de ces trisomies partielles, par des corrélations génotype-phénotype, a permis d'établir des cartes phénotypiques, identifiant des segments chromosomiques liés au syndrome, comprenant les différents aspects cliniques, physiques, cellulaires et physiologiques de la trisomie 21 (Delabar *et al.* 1993; Korenberg *et al.* 1994). Plusieurs

études ont rapporté que les segments chromosomiques situés dans la région 21q22 étaient responsables des composantes cliniques principales du phénotype du SD.

De ces études, deux grandes hypothèses ont été posées concernant l'origine du SD : celle de la région critique du SD (Delabar *et al.* 1993) et celle du syndrome de gènes contigus (Korenberg *et al.* 1994).

i. L'hypothèse de la région critique du syndrome de Down

En 1989, Z. Rahmani et coll. ont proposé l'existence d'une région critique du SD (DSCR), à partir d'une étude moléculaire menée sur deux patients avec le SD. La DSCR a été définie comme le segment commun à ces deux patients, sa taille estimée à 3 - 4 Mb autour du marqueur DS21S55. Toutefois, cette conclusion a été fondée sur l'hypothèse simple que les segments en trois exemplaires non partagés par ces patients ne contribuent pas de manière significative au phénotype. En 1993, une nouvelle étude est publiée (Delabar *et al.* 1993). Les analyses ont été effectuées sur 10 patients présentant une trisomie partielle, sur lesquels les auteurs ont évalué 33 paramètres cliniques. Ils ont ainsi rapporté qu'un tiers des phénotypes du SD est associé à la région DS1S55 (*Figure 6*).

Néanmoins, des incohérences ont été mises en évidence: la DSCR ne serait pas la région nécessaire et suffisante à la mise en place des symptômes du SD. Olson et collaborateurs ont créé et analysé un modèle murin de trisomie pour la région homologue à la DSCR: Ts1Rhr (Olson *et al.* 2004a). Dans l'article, ils le comparent au modèle déjà existant et bien défini, Ts65Dn homologue à une large région du HSA21 incluant la DSCR. Les souris Ts1Rhr présentent des phénotypes moins sévères que les Ts65Dn, elles ont tendance à être plus grosses que les contrôles alors que les Ts65Dn sont plus petites. De plus, les Ts1Rhr présentent un allongement du crâne, contrairement au Ts65Dn dont le crâne se raccourcit tout en s'élargissant. La mâchoire inférieure des Ts1Rhr est globalement plus grande que celle des Ts65Dn. En conclusion, les gènes présents en trois copies dans le modèle Ts1Rhr sont importants pour le phénotype mais d'autres gènes présents chez les Ts65Dn interviennent dans la pénétrance et la variabilité phénotypique. De plus, les travaux réalisés par Olson (Olson *et al.* 2007) et d'autre part par Belichenko (Belichenko *et al.* 2009) vont aussi dans le sens où les

gènes de la DSCR sont suffisants pour induire des modifications neurobiologiques retrouvées chez les patients.

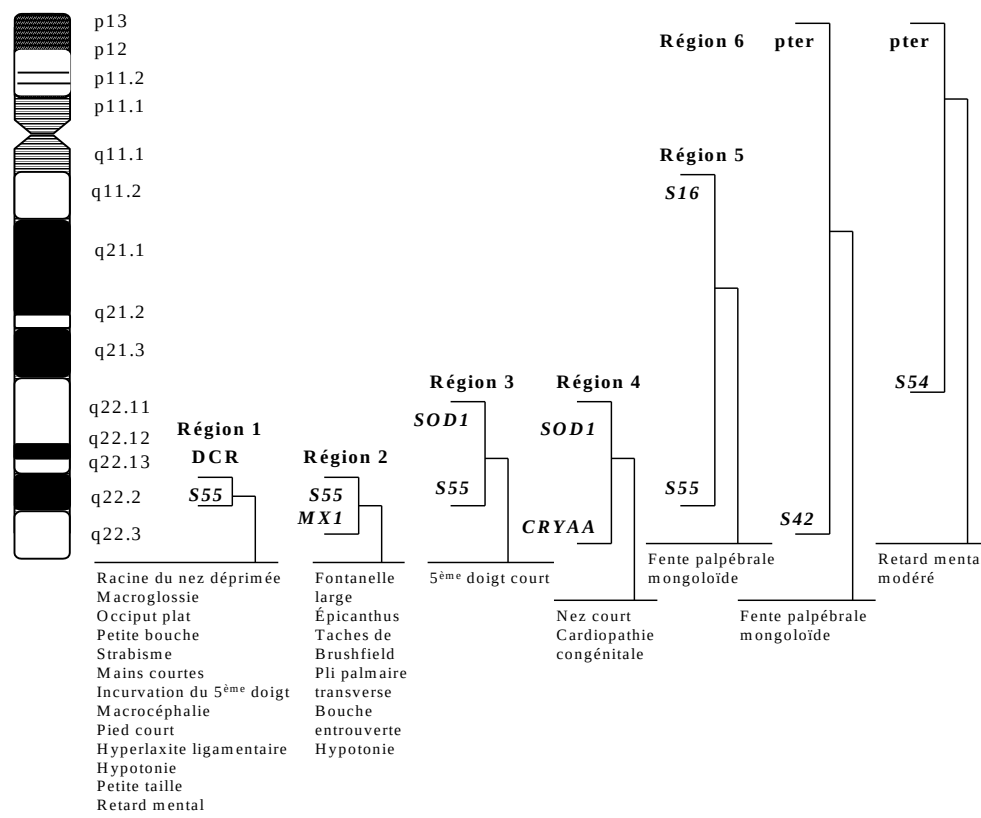


Figure 6: Cartographie moléculaire de 24 phénotypes du SD sur le HSA21 (d'après Delabar et al. 1993). Pour chaque phénotype, la région minimale du HSA21 (régions 1-6) a été définie comme la région tripliquée chez tous les patients exprimant ce phénotype.

ii. L'hypothèse du syndrome des gènes contigus

En 1994, Korenberg et collaborateurs ont cartographié vingt-cinq traits phénotypiques d'après l'étude de seize patients atteints de trisomies partielles. Ils montrent ainsi l'implication d'autres régions, que celles de la DSCR, dans l'expression des phénotypes du SD, en particulier la partie télomérique du HSA21. Parmi ces patients présentant des T21 partielles, trois sont atteints d'une trisomie pour la région proximale du bras long et présentent notamment des anomalies de la face, une microcéphalie, une petite taille et une hypotonie. Ces résultats sont en contradiction avec la carte génétique élaborée en 1993 par Delabar et collaborateurs. Ces auteurs suggèrent ainsi qu'un ou plusieurs gène(s) présent(s) dans une seule région devrai(en)t être en grande partie responsable(s) d'un trait phénotypique donné,

lorsque la pénétrance et l'expressivité du trait sont les mêmes chez les individus atteints de T21 complète et chez ceux possédant des duplications de la région. Au contraire, quand deux duplications chromosomiques non chevauchantes entraînent le même phénotype, ce trait doit être affecté par de multiples gènes.

L'apparition de la plupart des traits phénotypiques est due à la duplication de plusieurs régions. Par exemple, la petite taille des patients est associée à des duplications de la région centromérique du HSA21 ou de la partie télomérique. Ainsi, ce syndrome est le résultat des modifications de doses et des interactions de plusieurs gènes répartis sur l'ensemble du HSA21. Néanmoins, il existe bien des régions génétiques identifiables avec un rôle prédominant pour certains phénotypes : le phénotype "face plate" est principalement associé à une trisomie de la région de la DSCR mais d'autres gènes du HSA21 participent également à l'apparition de ce phénotype chez les individus trisomiques. Ils établissent ainsi une carte phénotypique qui montre que cette maladie est un syndrome de gènes contigus (Korenberg *et al.* 1994).

iii. Les nouvelles hypothèses

Des hypothèses plus récentes ont été envisagées pour cerner l'origine des phénotypes associés au SD : (1) l'effet de la sur-expression des gènes présents en trois exemplaires pourrait être direct ou indirect via la dérégulation globale de l'expression des gènes ; (2) certains phénotypes seraient liés à la T21 par des allèles spécifiques de gènes du HSA21 ou par l'interaction de ces produits de gènes avec des allèles spécifiques de gènes qui n'appartiennent pas au HSA21 ; (3) certains phénotypes seraient associés à des dérégulations de gènes du fait de la présence du matériel chromosomique supplémentaire et non pas de gènes particuliers (Antonarakis *et al.* 2001) ; et (4) des régions chromosomiques non codantes conservées au cours de l'évolution pourraient être impliquées dans l'expression génétique de ce syndrome (Dermitzakis *et al.*, 2002).

Plus récemment, l'analyse de l'expression des gènes du chromosome 21, à partir de lymphoblastes a permis de classifier les gènes du HSA21 suivant leur niveau d'expression ; ainsi, 29% des gènes sont sensibles à un effet de dose ou sont amplifiés, 56% sont compensés et 15% présentent une expression variable d'un individu à l'autre. L'expression de la plupart des gènes serait donc compensée chez les patients SD. Les variations d'expressions des gènes, observées dans la T21, sont contrôlées par des mécanismes impliquant des régulateurs en cis et en trans, qui agissent directement sur le réseau de régulation de la transcription. Les gènes

surexprimés sont fortement susceptibles d’être impliqués dans les phénotypes du SD, alors que les gènes à expression variable pourraient expliquer les variations phénotypiques observées chez les patients (Aït Yahya-Graison *et al.* 2007).

Enfin, Lyle *et al.* (2009) ont établi de nouvelles données contre l’hypothèse de la DSCR. Les auteurs ont étudié les aberrations chromosomiques de patients présentant des monosomies et des trisomies du HSA21 dans le but d’identifier des gènes (ou des petites régions) participant à l’établissement des phénotypes des patients. Toutes les M21 partielles de cette étude sont ainsi uniques et ne présentent aucun point de cassure commun. Concernant les T21, il s’avère que plus la région tripliquée est dense en gène, plus les phénotypes sont sévères. Les auteurs ont ainsi déterminé des régions de susceptibilité (RS) pour 25 des phénotypes observés dans la T21, et 27 RS pour les phénotypes de la M21. Ces RS seraient modifiées par d’autres loci du HSA21, ou encore par des régions ailleurs dans le génome.

II. Induction d’un stress respiratoire et de l’inflammation du poumon, par le lipopolysaccharide

Les infections pulmonaires étant la première cause de décès des patients T21, je me suis intéressée à la recherche des gènes du HSA21 sensibles aux effets de dose, impliqués dans la réponse pulmonaire, et qui pourraient expliquer la susceptibilité accrue des personnes porteuses du SD aux infections pulmonaires.

Pour cela, j’ai utilisé un système de mise à l’épreuve de la fonction pulmonaire en induisant une inflammation du poumon et une détresse respiratoire par instillation intra-nasale de lipopolysaccharide (LPS). Cette molécule est connue pour être un inducteur majeur de l’inflammation pulmonaire et du syndrome de détresse respiratoire (Brigham *et al.* 1986). Le LPS, via sa reconnaissance par le récepteur Toll-Like 4 (TLR 4) active une voie de signalisation aboutissant la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- κ B (Nuclear Factor kappa B). Le complexe NF- κ B induit alors la transcription de nombreux gènes impliqués dans l’inflammation comme par exemple le « tumor necrosis factor α » (TNF- α) et l’interleukine-6 (IL-6).

A. Le Lipopolysaccharide et la voie de signalisation associée au TLR4

1. Reconnaissance du lipopolysaccharide par le récepteur Toll-Like 4

Le LPS est un composant essentiel de la paroi des bactéries gram négatives. Sa structure est très complexe, mais les trois parties majeures sont le lipide A ou endotoxine, reconnu par TLR4, le coeur oligosaccharidique et l'antigène o (*Figure 7*).

Le LPS exerce son effet toxique par activation des cellules de l'immunité innée et des cellules endothéliales, ce qui induit l'expression des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF, l'IL-12 et l'IL-6, ainsi que le recrutement des neutrophiles.

Le TLR4 appartient à la famille des récepteurs Toll-like qui compte quatorze membres caractérisés par une extrémité NH₂-terminale extracellulaire riche en leucine et une extrémité COOH-terminale intracellulaire contenant un domaine caractéristique d'homologie avec le récepteur à l'IL-1. Ces TLR sont impliqués dans la reconnaissance d'un spectre propre d'éléments structuraux dérivés de pathogènes ou PAMP (pathogen-associated molecular pattern). Dans leur forme inactivée, les TLR sont monomériques, puis homo/hétéro-dimériques à la suite de leur activation, ce qui augmente le nombre de motifs pathogéniques reconnaissables.

Le TLR4 est celui qui a révélé l'importance cruciale de cette famille de récepteurs chez les mammifères (Poltorak *et al.* 1998). Les souris naturellement déficientes pour le TLR4 sont insensibles au choc septique induit par le LPS. Les TLR sont donc capables de discriminer de nombreux motifs pathogéniques et, ainsi orienter les voies de signalisation vers la réponse immunitaire la mieux adaptée.

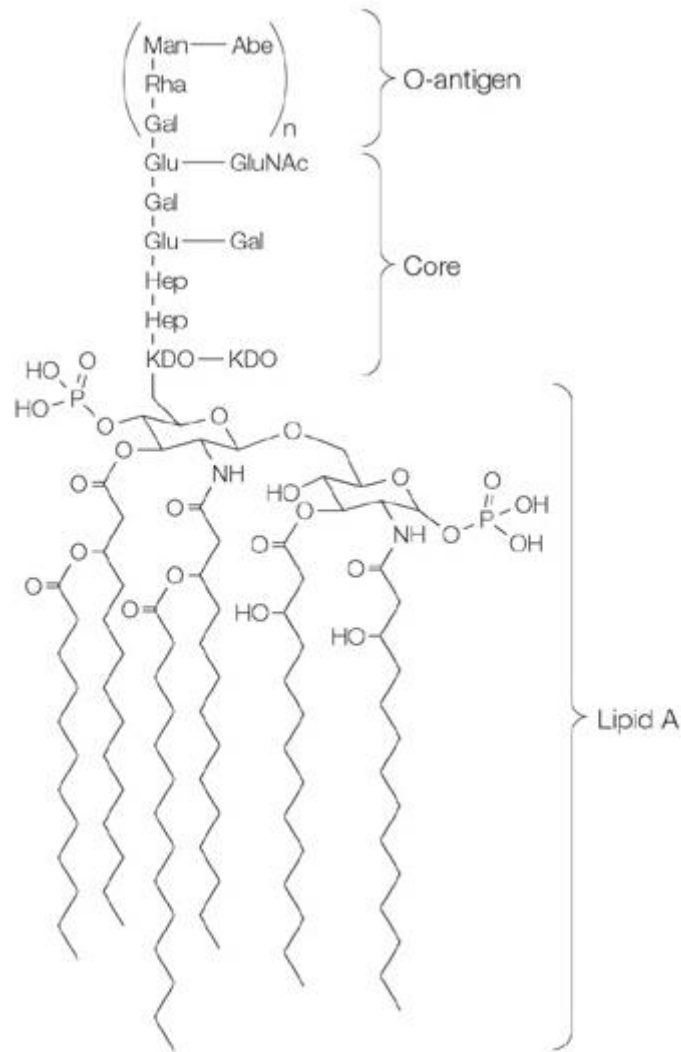


Figure 7: Représentation schématique de la structure du LPS provenant de *E. coli* (tirée de Samuel et al. 2005).

La liaison du LPS au TLR4 requiert l'intervention de facteurs solubles et/ou membranaires. Le facteur MD-2, le corécepteur CD14 et la glycoprotéine LBP participent à la cascade de signalisation associée au TLR4.

Le LPS circulant se lie à une protéine sérique appelée LBP (LPS-binding protein) (Fenton et al. 1998). Ce complexe est reconnu par la molécule CD14, un corécepteur ancré à la membrane par un groupement glycosyl phosphatidyl inositol et exprimé à la surface des monocytes/macrophages et des neutrophiles. CD14 seul ne possède pas de domaine intracellulaire et est donc incapable de transmettre un signal.

La molécule MD-2 a été identifiée comme une molécule accessoire associée au domaine extracellulaire de TLR4 et impliquée dans la stabilisation de cette molécule à la surface cellulaire.

Le complexe LPS/LBP/CD14 est reconnu par le TLR4 via MD-2 et active une voie de signalisation complexe via les complexes adaptateurs MyD88/TIRAP et TRIF/TRAM. Cette cascade de signalisation provoque à terme la translocation d'un facteur de transcription appelé NF- κ B. Celui-ci est responsable de l'induction de nombreux gènes de la réponse immune, notamment de cytokines pro-inflammatoires (Fenton *et al.* 1998; Ulevitch *et al.* 1995).

Enfin, une autre protéine de surface (protéine membranaire de type I), RP105, est aussi impliquée dans la reconnaissance du LPS. Cette protéine est préférentiellement exprimée à la surface des cellules B (Shimazu *et al.* 1999 ; Triantafilou *et al.* 2002).

Ainsi, plusieurs composants interviennent dans cette réponse au LPS, indiquant que le récepteur fonctionnel au LPS forme un complexe assez large, comme le montre la *figure 8*.

2. Rôle des molécules adaptatrices dans l'induction de l'inflammation

Aujourd'hui, au moins cinq acteurs majeurs sont considérés comme responsables de l'orientation des messages cellulaires induits par l'activation des récepteurs de la famille des TLR. Ces protéines caractérisées par leur domaine TIR (Toll Interleukine Receptor), sont MyD88, TIRAP (MyD88-adaptator-like), TRIF (TIR-domain-containing adaptator protein inducing IFN- β), TRAM (TRIF-related adaptator molecule) et SARM (sterile α and armadillo-motif-containing protein). Ce dernier est le seul de la famille à être un facteur répresseur puisqu'il aboutit à la diminution de l'induction TRIF.

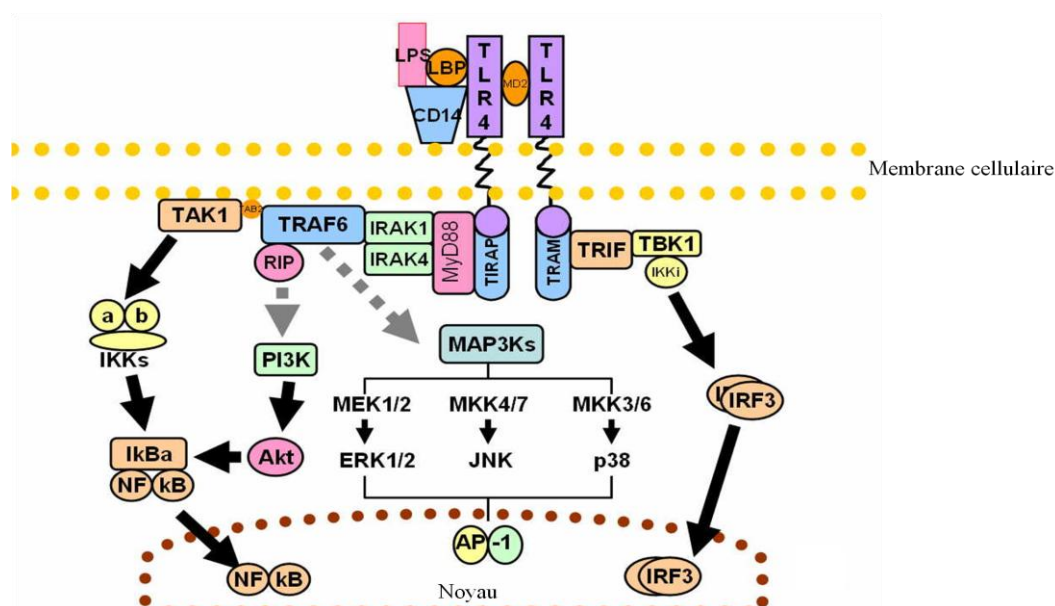


Figure 8: Voie de transduction du LPS.

i. MyD88

C'est une molécule adaptatrice a été découverte en 1990. La première fonction de MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene (88)) qui a été découverte en 1997, est son implication dans la voie de signalisation du récepteur à l'IL-1 (IL1-R1). Par la suite son rôle dans la voie de signalisation des récepteurs Toll-like a été mis en évidence (O'Neill *et al.* 2007).

MyD88 fonctionne comme un adaptateur entre les récepteurs à domaine TIR et des kinases impliquées dans la signalisation en aval.

L'adaptateur MyD88 se retrouve dans la voie de signalisation de la plupart des TLR excepté TLR3 et la voie indépendante de MyD88 du TLR4 (dépendante de TRIF). Des études génétiques utilisant des souris déficientes pour le gène codant pour MyD88, ont montré que ce facteur joue un rôle essentiel dans l'induction du facteur de transcription NF-κB et des gènes codant pour le TNF et l'IL-6.

MyD88 intervient aussi dans l'induction de l'interféron de type I via les voies de signalisation associées aux TLR7, TLR8 et TLR9. L'adaptateur MyD88 est essentiel pour l'activation de IRF7 par les TLRs, ceci aboutit la production d'IFNα (O'Neill *et al.* 2007).

Cependant, il existe une voie indépendante de MyD88 pour la mise en place de l'inflammation puisque chez les souris MyD88 déficientes la réponse au LPS est retardée mais pas abolie (Fitzgerald *et al.* 2003).

ii. TIRAP

TIRAP est le second adaptateur dans la famille des TIR-domain containing adaptator a avoir été découvert (Horng *et al.* 2001). Il est nécessaire pour la signalisation de TLR2 et de TLR4, servant de pont pour le recrutement de MyD88.

TIRAP fonctionne comme un cofacteur de MyD88, seulement en aval de TLR2 et TLR4.

Le dominant-négatif créé en mutant la proline de la boîte 2 de TIRAP, en histidine montre une inhibition de la voie de signalisation par TLR4, en revanche la voie aboutissant à la genèse d'IL-1 semble intacte (Horng *et al.* 2002).

De plus le peptide contenu dans la région appelée BB loop de TIRAP inhibe la signalisation à travers TLR4 et non TLR9 (Horng *et al.* 2001).

Ces résultats ont montré pour la première fois qu'il existe une spécificité dans la voie de signalisation dépendant du domaine TIR.

iii. TRIF

TRIF est un adaptateur nécessaire aux signalisations induites par l'activation des TLR3 et TLR4 mais son rôle est différent dans les deux voies. En effet, en aval du TLR3, la sous-unité p65 du facteur de transcription NF- κ B n'est pas utile, alors qu'elle est nécessaire pour la signalisation à travers la voie TLR4-TRIF (Wietek *et al.* 2003). Cette variation dans les réponses induites les rend plus appropriées et spécifiques.

TRIF est un acteur majeur dans la mise en place des molécules de co-signalisation (CD40, CD80 et CD86) après l'activation de TLR4. Les souris génétiquement invalidées pour les gènes MyD88 et TRIF sont viables mais insensibles aux chocs septiques et ne présentent pas de réponses inflammatoires normalement induites via le TLR4, par le LPS.

iv. TRAM

Cet adaptateur a été caractérisé par des analyses *in vivo* de sur expression et de délétion. Son rôle se limite à la voie d'activation du TLR4 (Yamamoto *et al.* 2003). TRAM est impliqué dans la production du TNF- α , de l'IL-6 et des autres médiateurs issus de l'induction de l'IRF3 (Interferon regulatory factor 3) (Oshiumi *et al.* 2003). Il faut souligner

que TRAM et TIRAP sont réciproquement exclusifs dans la signalisation du TLR4. En effet, l'association TIRAP/MyD88 réprime TRAM/TRIF et réciproquement.

v. SARM

A contrario de ses homologues à domaine TIR, SARM n'induit pas l'activation du facteur de transcription NF- κ B quand elle est sur exprimée (Liberati *et al.* 2004). SARM a été caractérisée comme étant un répresseur de l'activation des voies TLR3 et TLR4 par inhibition de l'adaptateur TRIF (Carty *et al.* 2006). L'activation de NF- κ B et IRF3 est par conséquent freinée.

3. L'activation de la voie NF- κ B

La famille des facteurs de transcription NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) compte cinq membres (p50, p52, p65, RELB et RELC) qui partagent une homologie de structures avec l'oncoprotéine virale v-Rel. Les protéines NF- κ B possèdent donc un domaine Rel dans leur partie N-terminale, ainsi qu'un domaine de trans activation dans la partie C-terminale.

Dans l'induction des réponses immunitaires, c'est le dimère p50/p65 qui constitue le facteur de transcription le plus important. Il intervient notamment dans la voie de signalisation LPS/TLR4.

En absence de stimulus, le dimère NF- κ B est séquestré dans le cytoplasme par une famille d'inhibiteurs, appelée I κ Bs (inhibiteur de kappa B), qui sont des protéines qui contiennent des domaines à répétitions d'ankyrine. Ces domaines masquent les signaux nucléaires de localisation (NLS) des protéines NF- κ B et les maintiennent séquestrées inactives dans le cytoplasme.

La liaison du LPS au TLR4, entraîne une homodimérisation du récepteur, ce qui provoque un changement de conformation du domaine TIR alors capable d'interagir avec MyD88. Cette protéine se lie ensuite à la sérine kinase IRAK (Akira *et al.* 2001) qui phosphoryle et active la molécule adaptatrice TRAF-6. A son tour, TRAF-6 active la kinase TAK1 qui est complexée aux protéines TAB1 et TAB2. Ce complexe activé va agir comme

un I κ B kinase kinase (I κ KK) et phosphoryler les kinases I κ B (I κ K). Celles-ci subiront ensuite une ubiquitination qui conduira à leur dégradation par le protéasome.

Suite à la dégradation d'I κ B, le complexe NF- κ B est alors libéré et rejoint le noyau où il pourra induire l'expression des gènes spécifiques possédant des domaines de liaison à NF- κ B. Ces gènes seront notamment impliqués dans la mise en place des réponses inflammatoires, liées à la survie des cellules ou encore à leur prolifération ;

NF- κ B active l'expression de son propre répresseur, I κ B- α . L'I κ B- α nouvellement synthétisé est adressé dans le noyau où il va entrer en compétition avec les molécules d'ADN pour la liaison à NF- κ B via la sous unité p65. Il s'ensuit alors une diminution de liaison de NF- κ B à l'ADN et donc une diminution de la transcription NF- κ B dépendante. Il se forme ainsi une boucle de régulation négative, par export du complexe NF- κ B/I κ B- α vers le cytoplasme, qui contrôle les niveaux d'activité de NF- κ B et régule ainsi l'amplitude des réponses inflammatoires.

B. L'inflammation des voies respiratoires

1. Le recrutement des neutrophiles

Les cellules inflammatoires sont en première ligne pour la détection des pathogènes, et agissent en synergie avec des facteurs solubles. Les macrophages alvéolaires résidents, les cellules épithéliales et endothéliales en sont les acteurs majeurs, et après reconnaissance du pathogène elles sont capables de produire de nombreux médiateurs de l'inflammation comme les cytokines et chimiokines.

L'administration de LPS dans les voies aériennes provoque une forte inflammation des voies respiratoires et du parenchyme pulmonaire. Cela conduit à l'activation des macrophages alvéolaires, qui se traduit par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α , et entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire, aboutissant au recrutement des neutrophiles dans le tissu pulmonaire, les alvéoles et les voies respiratoires.

Le rôle principal des polynucléaires neutrophiles (PNN) est l'élimination des agents pathogènes par phagocytose. Absents de la lumière alvéolaire à l'état normal, ils sont recrutés très rapidement et peuvent représenter la quasi-totalité des cellules alvéolaires lors des

infections respiratoires bactériennes ou lors d'instillation de LPS chez l'animal en réponse à la production locale de facteurs chimiotactiques et à la surexpression des molécules d'adhésion vasculaires.

Les neutrophiles recrutés acquièrent une activité bactéricide optimale sous l'influence de signaux activateurs comme le G-CSF, TNF α , IL-8 et MIP-2. Après avoir rempli leur fonction, les PNN deviennent apoptotiques et sont éliminés par les macrophages alvéolaires, prévenant ainsi le relargage des radicaux libres et des enzymes protéolytiques qu'ils contiennent.

2.L'importance des molécules de signalisation dans le recrutement des neutrophiles

Au cours de l'inflammation pulmonaire, de nombreuses chimiokines sont responsables du recrutement cellulaire. Les chimiokines sont des cytokines ayant un pouvoir chimiotactique, c'est-à-dire d'attraction et de régulation des mouvements de types cellulaires. Ce sont de petites protéines de poids moléculaire compris entre 6 et 14kDa. Ces protéines ont pour cibles des récepteurs de la membrane plasmique couplés aux protéines G (Olson et Ley 2002). Leur pouvoir attractif et/ou activateur est très puissant, notamment sur les neutrophiles et macrophages circulants. Ce paragraphe ne détaille pas toutes les chimiokines responsables du recrutement des cellules inflammatoires, mais met en relief les plus importantes.

Le TNF- α (tumor necrosis factor alpha) est une cytokine pléiotropique, produite par différents types cellulaires d'origine hématopoïétique (macrophages, neutrophiles, mastocystes et cellules T) et non hématopoïétique (cellules endothéliales et épithéliales). La production de TNF- α est induite suite à la reconnaissance par les TLR, des motifs dérivés des pathogènes. Il exerce un effet pro-inflammatoire par induction de l'expression de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales et d'autres types cellulaires. Ces molécules d'adhésion permettent une séquestration rapide des neutrophiles dans les capillaires sanguins pulmonaires.

CXCR2 est un récepteur indispensable à la mise en place de l'inflammation. Il permet la signalisation de deux chimiokines : KC (équivalent murin de l'IL-8 humaine) et MIP-2 (macrophage inflammatory protein-2) (Olson et Ley 2002). Le blocage de CXCR2 inhibe la venue des neutrophiles dans les poumons lors de la phase précoce de l'inflammation. Les neutrophiles sont les cibles de prédilection des peptides chimiotactiques, toutefois ils répondent différemment selon que leur CXCR2 se lie à MIP-2 ou KC (Lomas *et al.* 2003). Notons que KC est détectable dans la circulation sanguine, alors que MIP-2 est présent uniquement dans le parenchyme et l'espace aérien pulmonaire (Quinton *et al.* 2004). Néanmoins, ces chimiokines sont exprimées dans le tissu pulmonaire après injection péritonéale ou instillation intranasale de LPS (Aoki *et al.* 2002, Vanderbilt *et al.* 2003). Les cellules produisant ces peptides sont principalement les macrophages, les cellules épithéliales de type II et les cellules de la paroi vasculaire (Andonegui *et al.* 2003, Vanderbilt *et al.* 2003).

C. La bronchoconstriction induite par le LPS

1. Définition et mesure

i. La bronchoconstriction

La bronchoconstriction est caractérisée par une diminution du diamètre des bronches induite par une contraction active des cellules musculaires lisses et/ou par diminution des stimuli bronchodilatateurs. La contraction des muscles lisses, au niveau des bronches, est due à la fixation de l'acétylcholine sur les récepteurs muscariniques. Elle crée une obstruction des bronches qui pourra entraîner une difficulté respiratoire. L'air passe alors plus difficilement dans les bronches rétrécies ce qui se remarque par une ventilation rapide, sifflante et forcée (l'expiration est plus longue, active).

L'instillation de LPS dans un modèle murin entraîne une Hyper-Réponse des voies Aériennes (HRA) qui traduit la capacité qu'ont les bronches de réagir plus précocement et plus fortement lorsqu'elles sont stimulées.

ii. Mesure de la bronchoconstriction

Il existe deux méthodes principales pour mesurer la bronchoconstriction : la spirométrie et la pléthysmographie.

La spirométrie est un des tests de la fonction pulmonaire. Le test de spirométrie le plus important est la CVF (Capacité Vitale Forcée). Les autres tests de spirométrie sont la CV (Capacité Vitale ou Capacité Vitale Lente) et la VMM (Ventilation Maximale par Minute). La CVF est une expiration forcée. Le patient est assis et garde son dos droit durant l'examen. Le patient inspire, profondément afin de remplir ses poumons à fond, et expire après le plus fort et le plus vite possible tout l'air de ses poumons dans le spiromètre. Ensuite le patient inspire complètement et de manière forcée afin d'obtenir la courbe inspiratoire.

La pléthysmographie consiste à placer le sujet dans une petite pièce fermée où l'on peut mesurer les variations de volume de son thorax mais également les modifications de pression. Cet examen est plus précis que la spirométrie, et il permet d'autre part d'évaluer la résistance des bronches au passage de l'air. Le pléthysmographe non invasif est utilisé pour mesurer le flux respiratoire chez un individu conscient. Il transmet les paramètres standards de la fonction pulmonaire, telle que la bronchoconstriction. Le temps de pause respiratoire (PenH) reflète l'avancement de la bronchoconstriction et sa valeur se calcule de la façon suivante : $PenH = (Te/RT - 1) \times (PEF/PIF)$ avec Te : le temps d'expiration, RT : le temps de relaxation, PEF : le pic de flux expiratoire et PIF : le pic de flux inspiratoire.

Dans les deux méthodes, les résultats sont comparés aux valeurs théoriques ou prédites, qui sont calculées en considérant l'âge, le sexe, la taille et le groupe ethnique du patient. Pendant la première seconde de l'examen un patient sain expire environ 80% de sa CVF. On parle du VEMS (Volume Expiratoire Maximal par Seconde), un paramètre très important dans la spirométrie. L'indice de Tiffeneau caractérise le rapport VEMS/CV (Capacité Vitale) en pourcentage. Chez un patient obstructif cet indice est en dessous de 70%.

2. Les effecteurs de la bronchoconstriction

i. La bronchoconstriction est MyD88 dépendante

Les travaux menés par Noulain *et al.* (2005) montrent que des souris déficientes pour la protéine MyD88 sont insensibles au choc induit par le LPS, contrairement aux souris

sauvages. En effet, ces souris ne développent ni bronchoconstriction, ni lésions pulmonaires, même avec une forte dose de LPS (50µg). Un résultat identique est trouvé chez les souris TLR4^{-/-}, alors que des souris déficientes pour les récepteurs à l'IL-1 répondent de façon identique aux souris sauvage. Cela montre que la transmission du message induit par la liaison du LPS au TLR4 dépend uniquement de la voie MyD88.

Par ailleurs, des expériences de greffes de moelle osseuse de souris MyD88^{-/-} vers des souris WT irradiées d'une part, et de greffe de moelle osseuse de souris WT vers des souris MyD88^{-/-} irradiées d'autre part, ont montré que la bronchoconstriction induite par le LPS ne dépend que du génotype du receveur et confirment la nécessité de MyD88 dans l'induction de la bronchoconstriction. Par ailleurs, ces travaux montrent que les cellules hématopoïétiques, bien qu'elles soient les principales sources de production des cytokines pro-inflammatoires, ne sont pas les acteurs principaux de la détresse respiratoire induite par le LPS. Celle-ci étant entièrement due aux cellules non-hématopoïétiques radio-résistantes (Noulin *et al.* 2005).

ii. Rôle non redondant de TIRAP

MyD88, mais aussi TIRAP et TRIF sont impliqués dans la réponse au LPS, via le TLR4. Togbe *et al.* (2006) ont montré in vitro et in vivo, l'importance de la présence de TIRAP dans la bronchoconstriction. En effet, les souris déficientes pour TIRAP ne montrent aucune détresse respiratoire et ne souffrent d'aucunes lésions pulmonaires. Des macrophages dérivés de moelle osseuse de ces souris ne produisent qu'une très faible quantité de TNF-α après stimulation par le LPS. Les mêmes expériences menées sur des souris déficientes pour la protéine TRIF montrent des résultats identiques à ceux observés chez des souris sauvages. L'ensemble de ces données montre que TRIF n'est pas indispensable à la signalisation induite par le LPS, alors que TIRAP et MyD88 sont tous deux essentiels et ont des rôles non redondants dans la réponse au LPS.

iii. Le TNF-α, effecteur de la bronchoconstriction

Le TNF-α est synthétisé sous la forme d'un précurseur membranaire, puis est clivé par la métalloprotéase TACE, et forme un homotrimère sécrété. Les deux formes de TNF sont actives. Cependant, la forme membranaire (mem TNF) suffit à induire une réponse inflammatoire et une bronchoconstriction en réponse au LPS. Par ailleurs, l'utilisation de

souris présentant une délétion du TNF cellule spécifique a permis de montrer que les neutrophiles et les macrophages produisant le TNF sont nécessaires pour la mise en place de l'inflammation et de la bronchoconstriction ; alors que le TNF provenant des cellules T agirait comme un régulateur négatif (Togbe *et al.* 2007).

III. les modèles murins de Monosomie et Trisomie 21

Afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans la M21 et la T21, et plus particulièrement la susceptibilité aux infections pulmonaires, il est nécessaire de mener des études chez des organismes présentant le syndrome.

Cependant, ce paragraphe ne se veut pas une liste exhaustive de l'ensemble des modèles de T21 et M21, mais met en évidence ceux qui ont apporté de nouveaux éléments majeurs dans la compréhension des phénotypes de la T21 et M21.

A. Limites des études chez l'homme-nécessité des modèles animaux

La variation de doses géniques dans la M21 ou la T21 induit d'importantes conséquences au niveau du fonctionnement du système biologique, toutefois, ces dérégulations restent mal comprises. Par ailleurs, les effets issus de la monosomie sont plus sévères que ceux dûs à la trisomie. En effet, la M21 complète est létale au contraire de la T21. De plus, les corrélations génotype-phénotype restent mal comprises dans la M21. En outre, les études génétiques chez l'homme sont limitées et les patients présentant une trisomie partielle sont peu nombreux (moins de 10% des trisomies). Les contradictions présentes entre les deux cartes génétiques du SD (Delabar *et al.* 1993) (Korenberg *et al.* 1994) montrent la difficulté de ces analyses chez l'homme. Par conséquent, le recours au développement de modèles animaux pour ces syndromes est devenu nécessaire pour la compréhension des mécanismes génétiques et moléculaires qui entrent en jeu dans la T21 et la M21, et répond au besoin de la société de faciliter le traitement et la vie des patients

La souris est un modèle approprié pour l'étude de la physiopathologie moléculaire des phénotypes des aneuploïdies du HSA21 (Antonarakis 2001). Elle possède de nombreuses

similitudes génétiques, immunologiques, reproductives, physiologiques et pathologiques avec l'homme et permet d'étudier l'apparition des dysfonctionnements associés au SD et à la M21 au cours du temps, du développement embryonnaire à l'apparition de phénotypes plus tardifs.

Le développement des technologies de la génétique de la souris permet de générer des duplications et des délétions partielles à l'intérieur du génome. De plus, grâce au récent séquençage des génomes de l'homme et de la souris, nous pouvons obtenir une meilleure définition des régions d'homologies entre les chromosomes de ces deux espèces.

B. Les homologies entre l'homme et la souris

L'homologie entre le HSA21 et les chromosomes murins est maintenant bien définie grâce aux données de séquençage du génome murin et à l'analyse comparative entre les génomes murin et humain (Waterston *et al.* 2002). La longueur totale du génome murin est estimée à environ 2,5 Gb contre 2,9 Gb pour l'humain, et les deux génomes présentent actuellement 217 régions de synténie. La nature et l'étendue de cette conservation varient en fonction des chromosomes. Ainsi, plus de 90% des gènes murins possèdent un orthologue chez l'homme et plus de 200 régions synténiques sont actuellement décrites.

Trois régions chromosomiques murines regroupent la quasi-totalité des gènes du bras long du HSA21 (21q) (*Table 3 et Figure 9*).

- MMU16 : 22,59 Mb, du gène *Rbm1l* à *Znf295*.
- MMU17 : 1,1 Mb, du gène *Umodll1* à *Rrp1b*.
- MMU10 : 2,23 Mb, du gène *Pdxk* à *Prmt2*.

Le but de toutes les études réalisées est de déterminer quel gène ou groupe de gènes, ou autres unités fonctionnelles (miRNA, séquences non codantes conservées) du HSA21 sont impliqués dans les phénotypes du SD et de le M21. Afin de découvrir la fonction des gènes codés par le HSA21 l'expression des gènes peut être analysée par des méthodes de knock-out (KO : perte de fonction) ou de surexpression des gènes homologues dans des modèles murins.

Localisation HSA 21 (Mb)	Gène	Chromosome murin	Localisation MMU (Mb)	Taille de la région d'homologie (Mb)	Nombre de gènes
14,51	<i>Rbm11</i>	16	75,59	22,59	136
42,30	<i>Znf295</i>	16	98,18		
42,35	<i>Umodl1</i>	17	31,09	1,1	21
43,94	<i>Rrp1b</i>	17	32,19		
43,96	<i>Pdxk</i>	10	77,90	2,23	45
46,91	<i>Prmt2</i>	10	75, 70		

Table 3: Détails des régions d'homologie entre le chromosome humain et les chromosomes murins. Les localisations, les gènes bordant les régions, la taille d'homologie et le nombre de gènes présents dans la région sont présentés (tiré de Ensembl version 57).

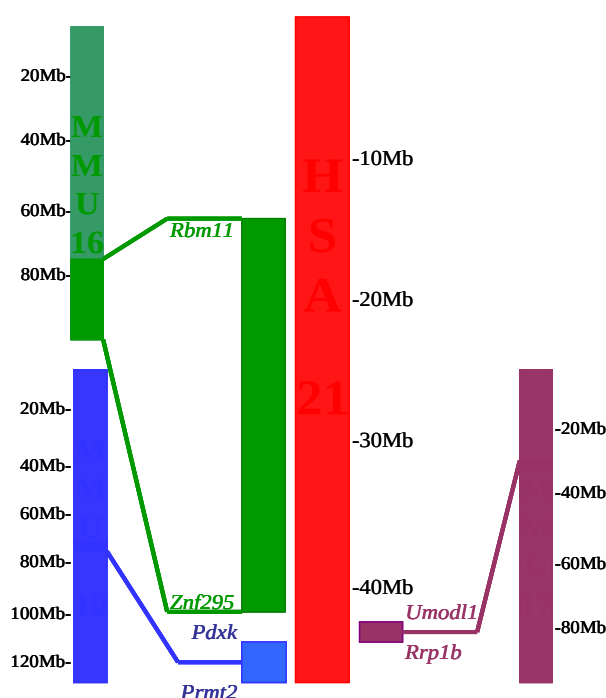


Figure 9: Chromosomes murins (MMU) homologues au chromosome 21 humain (HSA21).
Le HSA21 et ses trois régions d'homologie sur les chromosomes murins : MMU16, *Rbm11*-*Znf295* ;
MMU10, *Pdxk*-*Prmt2* et MMU17, *Umodl1*-*Rrp1b* (adapté de Ensembl version 57).

C. Les modèles murins du syndrome de Down

Afin d'étudier les conséquences de l'augmentation du nombre de dose des gènes dans la T21, et pour considérer les relations génotype-phénotype des gènes du HSA21 chez la souris, plusieurs approches sont classiquement utilisées. On retrouve la création d'animaux transgéniques sur-exprimant un ou plusieurs gènes, de souris transgéniques ayant incorporé dans leur génome des grandes régions d'ADN (BACs ou PACs) et des modèles murins avec une trisomie complète ou partielle du chromosome murin obtenue par ingénierie chromosomique.

1. Les modèles de surexpression de gènes candidats

Beaucoup de gènes portés par le HSA21 ont été surexprimés dans des modèles murins afin de définir les conséquences d'un déséquilibre du nombre de dose génique. La majorité des gènes étudiés jusqu'à présent sont localisés sur les chromosomes 10 et 16. Parmi eux, j'ai décidé de prendre comme exemples deux modèles murins de surexpression, des gènes *SOD1*, et *DYRK1A*.

i. Le gène *SOD1* et le métabolisme

Les premières souris transgéniques sur-exprimant un gène du HSA21 correspondent aux souris transgéniques pour le gène *SOD1* (Epstein *et al.* 1987). Ce gène est impliqué dans le métabolisme des radicaux libres. Ces souris présentent des anomalies caractéristiques des patients T21 au niveau des jonctions neuromusculaires des membres et de la langue, ainsi qu'une diminution du taux de sérotonine plasmatique et une hypoplasie du thymus (Peled-Kamar *et al.* 1995). De plus, des études du protéasome du cervelet et de l'hémisphère cérébral des souris transgéniques ont montré une diminution des activités du protéasome. Or, au cours du vieillissement normal, ces activités sont diminuées ; *SOD1* semble inhiber cette activité et pourrait permettre de comprendre les phénomènes du vieillissement précoce observé chez les patients avec le SD.

ii. Le gène *DYRK1A* et le système nerveux central

Dyrk1A est l'homologue du gène *minibrain* (*MNB*) de la *Drosophile*, essentiel pour la neurogenèse post-embryonnaire. (Tejedor *et al.* 1995). Ce gène est localisé sur le HSA21 dans la région 21q22.2 qui est associée à de nombreuses anomalies dans la T21 dont le retard mental. (Rahmani *et al.* 1989). Le gène humain est exprimé de façon ubiquitaire dans les tissus foetaux et adultes avec une forte expression dans le cerveau, au niveau du cortex, de l'hippocampe et du cervelet ainsi que dans le cœur (Guimera *et al.* 1996; Hämmerle *et al.* 2003). La recherche de gène candidat pour l'apparition du phénotype de retard mental dans le SD s'est appuyée sur la fonction du gène *minibrain*. En effet, les mutations de *MNB* provoquent une diminution de la taille des lobes optiques et des hémisphères centraux du cerveau ainsi que des problèmes de comportements (Tejedor *et al.* 1995).

Les modèles murins de KO ou transgéniques sont venus soutenir cette hypothèse. En effet, le KO créé par l'équipe de Fotaki en 2002 est létale au stade embryonnaire E14,5. Les souris hétérozygotes (*Dyrk1a* +/-) présentent une diminution de la taille de plusieurs parties du cerveau, une réduction du nombre de neurones dans les colliculi supérieurs mais également une augmentation de la densité neuronale dans le cortex et le thalamus (Fotaki *et al.* 2002).

Altafaj et collaborateurs ont créé un modèle murin transgénique ayant incorporé un cDNA surexprimant le gène *DYRK1A* humain complet : Tg*DYRK1A*. Ces souris présentent des défauts de la mémoire et de l'apprentissage spatial liée à l'hippocampe et au cortex préfrontal ainsi que des altérations de la LTP (long-term potentiation) et de la LTD (long-term depression), ce qui suggère que *DYRK1A* a un rôle dans la plasticité synaptique (Altafaj *et al.* 2001; Ahn *et al.* 2006).

La lignée transgénique avec insertion du YAC 152F7 (Smith *et al.* 1995), montre une augmentation significative du poids du cerveau et de la densité neuronale dans le cortex cérébral par comparaison avec les lignées contrôles (Smith D.J. et Rubin E.M. 1997). L'équipe de Delabar a réalisé une mesure par Imagerie par Résonnance Magnétique (IRM), du volume de cerveau de cette lignée. Le changement de morphologie des cerveaux de cette lignée est visible très tôt dans le développement : dès le jour 2 post-natal. Les changements régions spécifiques ont été caractérisés à partir du jour post-natal 5 jusqu'à 15 mois. Les résultats obtenus montrent que la surexpression de *Dyrk1a* pourrait être région spécifique, avec une augmentation majoritaire dans la région thalamus-hypothalamus (24%) (Sebrié *et al.* 2008).

2. La trisomie complète

Très récemment, l'équipe d'Eugène Yu a décrit le premier modèle murin récapitulant les trisomies pour les trois régions homologues au HSA21. La lignée nommée Dp(10)1Yey/+ ; Dp(16)1Yey/+ ; Dp(17)1Yey/+ présente essentiellement des anomalies du système neurologique. L'étude de la capacité d'apprentissage par le test de la piscine de Morris a révélé un défaut de la fonction de l'hippocampe. Ce résultat est confirmé par le fait que ces mutants présentent un déficit de la LTP hippocampale et une hydrocéphalie (augmentation du volume des espaces contenant le liquide céphalo-rachidien). Ces résultats montrent que lorsque l'ensemble des gènes du HSA21 sont en trois copies, le phénotype qui ressort est un dysfonctionnement du système cognitif. Grâce à son génotype et aux phénotypes qu'il présente, ce nouveau modèle murin pourrait être une nouvelle référence pour la compréhension des anomalies cognitives que développent les patients SD (Yu *et al.* 2010).

3. La trisomie complète Ts16

La lignée trisomique Ts16 a été obtenue à partir de croisements entre des mâles double hétérozygotes pour des translocations robertsoniennes impliquant le chromosome 16 et des femelles diploïdes (Cox *et al.* 1984). Les deux translocations ont été transmises à une petite partie de la descendance qui était donc trisomique pour le MMU16.

Le modèle Ts16 associe les caractéristiques cardiaques aux malformations craniofaciales et oculaires, semblables à celles observées chez les patients trisomiques 21. Les Ts16 présentent des défauts septaux ventriculaires et atriaux avec des connections ventriculoartérielles anormales. Des anomalies morphologiques ont également été décrites pendant le développement embryonnaire du néocortex chez les Ts16, ces souris présentent globalement un cerveau plus petit et quelques changements structuraux (Haydar *et al.* 1996).

Ce modèle présente certaines caractéristiques du SD, mais son utilité comme modèle du SD est limitée par plusieurs facteurs. Tout d'abord, les souris Ts16 meurent *in utero* ou à la naissance, ce qui limite leur étude au développement embryonnaire. De plus, la lignée Ts16 possède une copie supplémentaire du MMU16 dans sa totalité, Elle présente donc une trisomie pour la région du MMU16 homologue au HSA21, mais également pour les régions

du MMU16 homologues aux HSA3, 8, 16 et 22. On sait d'autre part que plusieurs gènes situés sur l'extrémité distale du bras long du HSA21, sont essentiels pour le phénotype du SD et ne sont pas situés sur le MMU16. Ainsi, les souris Ts16 ne sont pas trisomiques pour certains gènes du HSA21 et le sont pour d'autres gènes qui ne sont pas impliqués dans la pathogénie de la T21 (Dierssen *et al.* 2001).

4. Le modèle transchromosomique Tc1

Le modèle transchromosomique Tc1 possède, en plus de son patrimoine génétique, une copie du chromosome 21 humain quasi complète (90 à 92%). Ce modèle a été obtenu par la technique XMMCT (X-irradiation microcell-mediated chromosome transfer) (O'Doherty *et al.* 2003).

Ces souris transchromosomique présentent plusieurs caractéristiques phénotypiques du syndrome de Down. Elles montrent des altérations du comportement avec un défaut d'apprentissage observé dans le test de reconnaissance d'objet et une LTP anormalement peu élevée. Au niveau de la face, on retrouve une mandibule plus petite que chez le groupe des contrôles. De plus, ces souris montrent des anomalies du système immunitaire avec un défaut d'activation des lymphocytes T. Enfin, 70% des Tc1 présentent des anomalies cardiaques.

Malgré de nombreux phénotypes retrouvés chez les patients, ce modèle est quelque peu difficile à étudier car il présente un mosaïsme, c'est-à-dire que certaines cellules ont perdu le HSA21 pendant leur prolifération. En effet, l'analyse par PCR quantitative montre que le chromosome surnuméraire n'est pas présent dans toutes les cellules de l'organisme. Les souris Tc1 présentent un mosaïsme dans les différents organes. Ainsi, 55% des cellules de la moelle épinière possèdent le HSA21.

5. Les modèles de trisomies partielles

i. Le modèle Ts65Dn

Le modèle Ts65Dn ou Ts(17¹⁶)65Dn est le modèle de référence pour l'étude de la T21. Il a été généré par irradiation induisant une translocation chromosomique réciproque

entre l'extrémité télomérique du MMU16 et le centromère du MMU17 (Davisson *et al.* 1993). Ce modèle murin possède donc une trisomie partielle du MMU16 qui s'étend en amont du gène *Mrpl39* jusqu'au gène *Zfp295*, englobant 167 gènes, incluant la DSCR, mais également 5 % du MMU17 non homologues au HSA21. Le taux de transmission pour le chromosome modifié Ts(17¹⁶)65Dn à la naissance est de 50 % (transmission Mendélienne). Cependant, une létalité postnatale sélective dans les 48h qui suivent la naissance se traduit par une transmission du chromosome de 34 % au sevrage.

Contrairement aux souris Ts16, cette lignée trisomique survit à l'âge adulte, et permet au-delà du développement embryonnaire d'étudier des caractéristiques cliniques du SD plus tardives. Cet effet de dose génique, avec plus de la moitié des homologues du HSA21, induit l'apparition de plusieurs phénotypes chez ces souris qui sont comparables à ceux observés pour le SD, chez l'homme.

Un examen morphologique de ces animaux indique la présence d'anomalies cardiovasculaires, et plus précisément d'une voûte aortique droite accompagnée de défaut du septum, dans 8,3 % des cadavres de nouveaux-nés trisomiques examinés (Moore 2006).

Les souris Ts65Dn présentent des anomalies phénotypiques incluant un retard précoce de développement (Holtzman *et al.* 1996), hyperactivité (Reeves *et al.* 1995), un poids et une taille réduite, des anomalies de la face (Olson *et al.* 2004 ; Hill *et al.* 2007), une dégénération neuronale liée à l'âge (Cooper *et al.* 2001), ainsi que des défauts d'apprentissage et de comportement (Reeves *et al.* 1995; Holtzman *et al.* 1996). Il semble également que cette aneuploïdie affecte l'ostéogenèse ou l'homéostasie osseuse, car la structure du tissu spongieux de l'os sphénoïde des Ts65Dn est altérée (Parsons *et al.* 2007). Tous ces phénotypes se retrouvent chez les patients atteints du SD.

Les défauts d'apprentissage suggèrent en particulier un dysfonctionnement de l'hippocampe (Hyde *et al.* 2001). Les individus Ts65Dn présentent, au niveau du gyrus dentelé, un nombre de neurones significativement réduit et ce très tôt au cours du développement, ce qui pourrait contribuer au déficit cognitif (Insausti *et al.* 1998 ; Lorenzi *et al.* 2006). De plus, ces souris adultes présentent des déficits dans la LTP (« long-term potentiation ») induite par stimulation *in vitro* des synapses de la CA1 de l'hippocampe. Costa

et coll. associent cette anomalie à une augmentation de l'inhibition GABAergique ou à un autre défaut du circuit inhibiteur dans l'hippocampe de ces individus (Costa *et al.* 2005).

Les analyses de transcriptome sur ce modèle murin ont confirmé une surexpression globale des gènes présents en trois copies, de 50 % (facteur de 1,5) dans plusieurs organes des Ts65Dn (Saran *et al.* 2003), ainsi que des mécanismes de compensation dans certains organes (Kahlem *et al.* 2004). Les expériences réalisées chez l'homme corroborent les analyses faites chez la souris. En effet, une copie surnuméraire du HSA21 entraîne une surexpression globale (x 1,5) des gènes présents sur ce chromosome (FitzPatrick *et al.* 2002).

ii. Le modèle Ts1Cje

Le modèle murin Ts1Cje présente une trisomie partielle du chromosome 16 murin qui s'étend du gène *Sod1* jusqu'au gène *Zfp295*, englobant 105 gènes. Ce modèle a été obtenu par translocation réciproque entre le MMU12 et le 16 (Ts(12¹⁶)Cje), survenue pendant une expérience d'inactivation du gène *Sod1* (Sago *et al.* 1998). Ces souris survivent à l'âge adulte et se reproduisent.

Les souris Ts1Cje présentent des troubles de l'apprentissage et de la mémorisation moins sévères que ceux observés chez les Ts65Dn, et ces déficits ne sont pas accompagnés d'une perte cholinergique (Sago *et al.* 1998). Le volume cérébelleux est réduit bien que le nombre de cellules granulaires et de Purkinje ne soit pas significativement différent (Olson *et al.* 2004a). A l'inverse des Ts65Dn, les souris ne présentent pas d'hyperactivité mais sont plutôt hypoactives; leurs déficits d'apprentissage et les anomalies comportementales sont moins sévères (Sago *et al.* 2000). Ces souris présentent des anomalies crânio-faciales mais la brachycéphalie caractéristique n'est pas observée (Richtsmeier *et al.* 2002). Ces individus ne présentent pas, contrairement aux Ts65Dn, de défaut cardiaque ce qui laisse penser que le ou les loci responsable(s) de ce phénotype se trouvent) dans l'intervalle *Mrpl39- Sod1*.

Des études du transcriptome dans le cervelet des souris Ts1Cje (Dauphinot *et al.* 2005 ; Laffaire *et al.* 2009) ont montré que les gènes du MMU16 présents en trois copies chez

ce modèle sont surexprimés de 50% et que le transcriptome est modifié au cours du développement postnatal du cervelet de ces souris comme dans le modèle Ts65Dn.

iii. Le modèle Ts1Rhr

Afin d'évaluer la contribution de la DSCR au phénotype des patients T21, Reeves et coll. ont créé des souris trisomiques pour cette région, en utilisant la technique de recombinaison Cre/loxP dans les cellules embryonnaires souches (ES). Cette région comprend 40 gènes entre *Cbr1* et *Orf9*. Ils ont ainsi obtenu deux lignées de souris, des trisomiques pour la région DSCR appelées Ts1Rhr et des monosomiques, les Ms1Rhr (voir le paragraphe « le modèle Ms1Rhr » de la page 49).

Les Ts1Rhr adultes sont sensiblement plus grandes que les euploïdes contrôles (*Figure 10*), contrairement aux individus de la lignée Ts65Dn qui sont plus petits que leurs contrôles.

Contrairement aux souris Ts65Dn, les Ts1Rhr présentent un crâne plus grand que les euploïdes avec un allongement rostrocaudal et elles ne présentent pas de brachycéphalie. La mâchoire inférieure des Ts1Rhr est globalement plus grande que celle des Ts65Dn. Les observations réalisées à partir des analyses comparatives effectuées sur les mâchoires inférieures des souris trisomiques Ts65Dn et leurs contrôles sont semblables à celle établies chez les patients T21. Ces résultats suggèrent que certaines anomalies crânio-faciales ne résulteraient pas de la triplication de la DSCR. Ces nouveaux modèles de trisomie et de monosomie partielle portant uniquement sur la région critique DSCR décrite chez l'homme (Delabar *et al.* 1993) confirme que cette région n'est pas la seule responsable des phénotypes du SD (Olson *et al.* 2004). Les souris Ts1Rhr présentent des phénotypes moins sévères que les Ts65Dn et montrent que cette région seule n'est pas suffisante pour produire les anomalies morphologiques observées chez les patients trisomiques. Reeves et coll. suggèrent que certaines anomalies retrouvées chez les patients T21 et chez les Ts65Dn ne seraient pas dûes à la triplication d'un ou plusieurs gènes d'une région spécifique du chromosome mais à l'interaction entre gènes non contigus (Olson *et al.* 2004a). Ces résultats sont en accord avec des résultats précédents de deux patients T21 partiels, lesquels présentent une triplication de

la DSCR ou de la région *Sod1-D21S55*, sans aucune brachycéphalie, mais les deux ont un faciès caractéristique de la T21 (Rahmani *et al.* 1989).

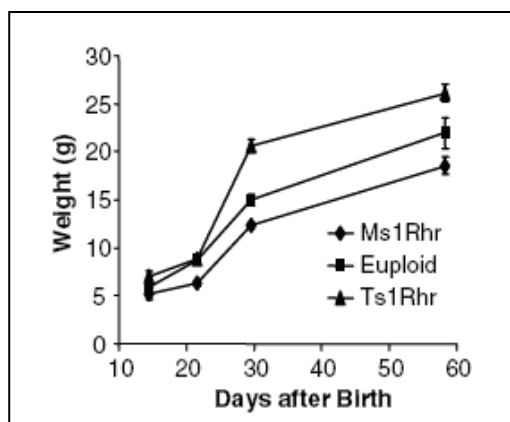


Figure 10: Analyse de la prise de poids durant 60 jours après la naissance chez les souris *Ms1Rhr* et *Ts1Rhr* par rapport aux souris contrôles euploïdes (tiré de Olson *et al.* 2004).

iv. Le modèle *Dp(16)Yu*

En avril 2007, Li et coll. ont publié l'analyse d'un nouveau modèle murin de trisomie, la lignée *Dp(16)1Yu*, qui présente une duplication de 22,9 Mb comportant 224 gènes, de *Lipi* à *Zfp295* du MMU16, qui est homologue à la région 21q11q22.2 chez l'homme. Cette duplication a été obtenue en combinant le système de recombinaison *Cre-LoxP*, au système *Hprt*. Ce nouveau modèle murin présente à la fois des anomalies cardiaques et gastro-intestinales. Ces défauts expliquent le faible taux de survie des nouveau-nés trisomiques *Dp(16)1Yu* qui est de 38% au sevrage, alors qu'au stade E18,5 (ou 18,5 dpc day post coïtum). Les trisomiques *Dp(16)1Yu* représentent 50% des embryons (ségrégation mendélienne). L'analyse morphologique révèle que 37% des embryons *Dp(16)1Yu/+* présentent des anomalies cardiaques, que 22% présentent un pancréas annulaire et 26% des anomalies structurales de l'intestin, semblables à celles observées chez les patients atteints du SD. Les souris *Dp(16)Yu* sont trisomiques pour une région plus grande (de *D930038D03Rik* à *Zfp295*) que les souris *Ts65Dn* (de *Mrpl39* à *Zfp295*).

v. Le modèle *Ts1Yah*

L'équipe au sein de laquelle j'ai réalisé mes travaux de thèse a utilisé la technique MICER, décrite par Adams *et al.* (2004) afin de concevoir le modèle *Ts1Yah*. Cette lignée est trisomique pour une région de 0,59 Mb du MMU17, et qui comprend 13 gènes entre *Abcg1* et *U2af1*, homologue à la partie distale du HSA21.

L'analyse de la lignée, publiée récemment (Pereira *et al.* 2009) montre que le modèle est viable et fertile, avec une transmission Mendélienne de la duplication.

Les souris ne montrent aucun déficit au niveau de la coordination motrice, ni dans l'activité exploratrice et ne sont ni plus ni moins anxieuses que les contrôles diploïdes.

Cependant, le test du labyrinthe en Y montre un déficit de la mémoire à court terme chez les Ts1Yah. Ce résultat est confirmé par une moins bonne performance de ces souris au test de la reconnaissance d'objet. Contre toute attente, l'étude de l'apprentissage spatiale par le test de la piscine de Morris (MWM) montre que les souris Ts1Yah performant mieux. En effet, les souris trisomiques passent plus de temps dans le quadrant où la plateforme est submergée, et la trouvent plus vite que les souris contrôles (*Figure 11*).

De plus, la mesure de la LTP (long term potentiation) révèle une réponse plus importante et plus longue des neurones de l'hippocampe des Ts1Yah. Ce résultat est en accord avec celui de la MWM et soutient donc l'hypothèse d'un meilleur apprentissage spatial chez les Ts1Yah. L'analyse de l'expression des gènes de la région dans quatre régions du cerveau montre que la surexpression des gènes *Pde9a*, *Ndufv3*, *Wdr4*, *Pknox1* et *CBS*, dans l'hippocampe pourrait faciliter l'apprentissage et la mémoire chez ces souris Ts1Yah.

L'obtention de résultats inattendus chez des souris trisomiques montre bien la complexité de la combinatoire génétique à l'origine de la variation phénotypique des patients SD. Ce travail établit la contribution des gènes de la région *Abcg1-U2af1* dans le phénotype de la T21, mais suggère aussi de nouvelles voies de régulation dans l'étude de la mémoire.

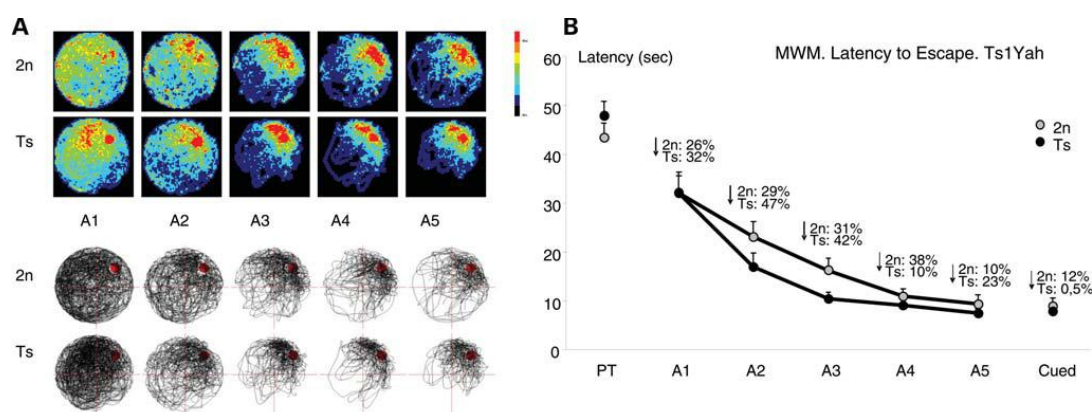


Figure 11: Etude de l'apprentissage spatiale chez les souris Ts1Yah. Dès le deuxième jour les Ts1Yah ont focalisé leur recherche dans le quadrant cible (A) et sont donc plus efficaces que le groupe sauvage pour trouver la plateforme (B) (tirée de Pereira et al 2009).

D. Les modèles de monosomies partielles

1. Le modèle Ms1Rhr

Reeves et coll. ont également créé des souris monosomiques pour la DSCR : les Ms1Rhr. Tout comme les Ts1Rhr, la région comprend 40 gènes entre *Cbr1* et *Orf9*. Les individus Ms1Rhr sont plus petits que les contrôles de même fond génétique (F1B6129) de la naissance à l'âge adulte (*Figure 10*).

Différentes études montrent que la trisomie des gènes de la DSCR chez les Ts1Rhr, n'est pas suffisante pour reproduire les anomalies crânio-faciales et les défauts structuraux et fonctionnels associés à l'hippocampe qui sont observés chez les souris Ts65Dn et qui sont semblables à ceux des patients avec le SD. Afin de vérifier si les gènes de la DSCR sont nécessaires pour produire les phénotypes qui lui ont été attribués (Delabar *et al.* 1993 ; Korenberg *et al.* 1994), Olson et coll. ont réalisé un croisement entre les souris Ms1Rhr et les souris Ts65Dn. Les souris Ms1Rhr-Ts65Dn ainsi obtenues, possèdent la DSCR à l'état diploïde et une trisomie pour environ 70% des gènes tripliqués chez les Ts65Dn. Comme pour les Ts65Dn et contrairement aux Ts1Rhr, le crâne des individus trisomiques Ms1Rhr-Ts65Dn est plus petit que les contrôles euploïdes propres à la lignée. Les souris Ms1Rhr-Ts65Dn ne montrent cependant pas de changement disproportionné le long de l'axe rostrocaudal et mediolateral, elles ne présentent donc pas, contrairement au Ts65Dn, une brachycéphalie.

L'association Ms1Rhr-Ts65Dn a permis de démontrer que la trisomie de la DSCR seule, n'est pas suffisante pour reproduire les défauts structuraux et fonctionnels associés à l'hippocampe qui sont observés chez les Ts65Dn et les patients atteints du SD. Cependant, dans le cas des souris Ms1Rhr-Ts65Dn trisomiques pour 70 gènes (*Mrpl39-Cbr1 + Orf9-Zfp295*), pour lesquelles la DSCR est à l'état diploïde, les résultats obtenus en piscine de Morris sont identiques à ceux des euploïdes, ce qui montre que cette région est nécessaire au phénotype observé chez les Ts65Dn (Olson *et al.* 2007).

Ainsi, les dysmorphologies crânio-faciales des Ms1Rhr-Ts65Dn sont semblables à celles des Ts65Dn, alors que les anomalies chez les Ts1Rhr sont distinctement différentes. Par conséquent, bien que les gènes de la DSCR contribuent au développement du crâne (résultats

Ts1Rhr), leurs effets sont modulés par d'autres gènes situés entre Cbr et Mrpl39 dans les caractéristiques du modèle Ts65Dn (résultats des Ms1Rhr-Ts65Dn).

2. Le modèles Ms1Cje

Afin de mieux comparer les phénotypes observés chez les souris Ts65Dn par rapport à ceux des Ts1Cje, Sago et coll. ont créé le modèle de souris Ms1Cje, monosomique pour la même région. Un croisement avec les souris trisomiques Ts65Dn, permet de générer une lignée trisomique pour la région *Mrpl39-Sod1* (*Sod1* non inclus) qui contient 62 gènes (Ms1Cje-Ts65Dn), et qui correspond à la partie non tripliquée chez les Ts1Cje mais tripliquée chez les Ts65Dn (Sago *et al.* 2000 ; Antonarakis 2004). L'analyse de ces souris montre des anomalies comportementales moins sévères que les Ts65Dn. Des études montrent que ces souris présentent de légers troubles d'apprentissage qui ne sont pas accompagnés de pertes cholinergiques (Sago *et al.* 2000). Alors que les souris Ts65Dn sont hyperactives et que les souris Ts1Cje sont hypoactives, les Ms1Cje-Ts65Dn ont une activité normale. Ces résultats indiquent que les gènes tripliqués dans la région Ms1Cje-Ts65Dn interagissent avec des gènes en trois copies dans les Ts1Cje pour produire l'hyperactivité caractéristique des souris de Ts65Dn.

Cette analyse permet de mettre en évidence l'interaction génétique entre les régions *Mrpl39-Sod1* et *Sod1-Znf295* pour l'apparition des phénotypes rencontrés chez les Ts65Dn. Avec ces résultats, l'hypothèse de la DSCR est controversée par l'analyse comparative des deux modèles de trisomies partielles Ts65Dn et Ts1Cje, qui sont tous deux trisomiques pour cette région.

Je finis ce paragraphe sur la présentation des modèles de T21 et M21 en notant qu'aucun des modèles analysés (*Figure 12*) ne met en évidence une quelconque susceptibilité aux infections pulmonaires alors qu'il s'agit de la seconde cause de décès des patients. Cela est très probablement dû au fait que les phénotypes d'inflammation du poumon et de détresse respiratoire n'ont pas ou peu été étudiés.

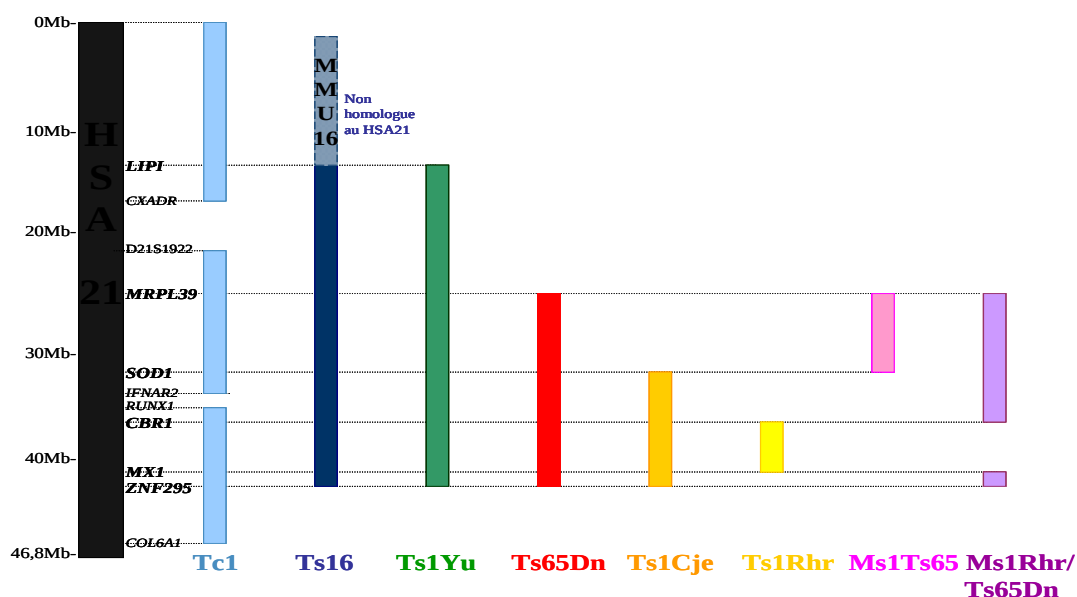


Figure 12: Représentation schématique des régions homologues au HSA21 tripliquées dans les lignées Tc1 Ts16, Dup(16)Yu, Ts65Dn, Ts1Cje, Ts1Rhr, Ms1Cje/Ts65Dn et Ms1Rhr/Ts65Dn.

IV. Le modèle de monosomie Ms1Yah pour la région Prmt2-Col6a1

Les deux modèles de monosomies décrits précédemment sont situés sur le MMU16. Cependant, la contribution des régions additionnelles, homologue au HAS21, dans la M21 demeure peu claire. Ainsi, le développement de nouveaux modèles monosomique paraît crucial pour évaluer la contribution des gènes dosage-sensibles.

Dans le laboratoire, nous nous sommes entre autre intéressé à la région d'homologie du chromosome 10 murin, entre les gènes *Prmt2* (aussi appelé *HRMT1L1*) « Protéine Arginine N-Méthyltransférase 2 » et *Col6a1* « collagène, type VI, alpha 1 » (Figure 13). Cette région s'étend sur 0,5 Mb et comprend 14 gènes dont 8 ont une fonction connue.

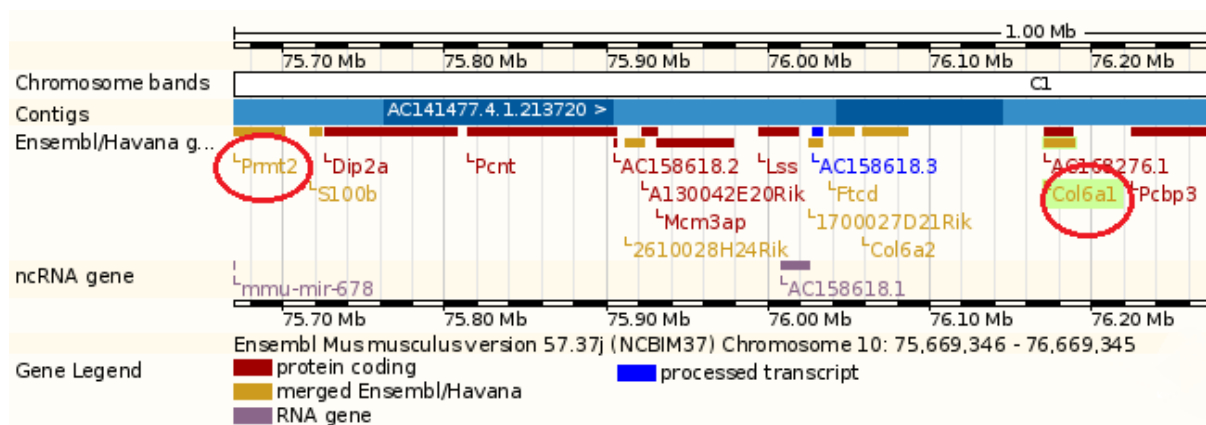


Figure 13: Représentation des gènes de la région *Prmt2-Col6a1* sur le MMU10, homologue à la partie distale du HSA21. Tirée de Ensembl version 57

A. Les gènes de la région *Prmt2-Col6a1*

Parmi les 14 gènes contenus dans cette région de syngénie, 8 ont été décrits dans la littérature.

Les gènes *Col6a1* et *Col6a2* codent des protéines de la famille du collagène et sont respectivement responsables de la myopathie de Bethlem et la dystrophie musculaire congénitale d'Ullrich (Lucioli *et al.* 2005) (Lampe et Bushby 2005).

La protéine arginine méthyltransférase codée par le gène *Prmt2* ou *Hrmt111* régule le traitement et la maturation de l'ARNm en modulant l'activité des protéines de fixation à l'ARN par méthylation, et est aussi connue comme étant un inhibiteur de la voie NF-κB (Ganesh *et al.* 2006).

Le gène de la péricentrine (*Pcnt2*) code pour une protéine qui est un composant conservé de la matrice filamenteuse du centrosome. Il est exprimé durant le développement (Miyoshi *et al.* 2006) et est également trouvé à la base des cils primaires des cellules ciliées (Salisbury *et al.* 2004).

Le gène de la lanostérol synthase (*Lss*) qui a pour fonction la catalyse du 2,3-oxidosqualene en lanosterol est exprimé dans le foie et dans l'appareil branchial, ce qui suggère un rôle dans la régulation du cholestérol (Mori *et al.* 2006).

Le gène *Ftcd* (Formiminotransferase *cyclodeaminase*) est exprimé dans le foie, mais paraît peu ou pas détecté dans le cerveau néonatal (Gitton *et al.* 2002). La protéine Ftcd est une enzyme bifonctionnelle qui transforme le formiminoglutamate, un métabolite de la voie de dégradation de l'histidine, en folate.

Chez la souris le gène *Dip2* a été cloné et des études d'hybridation *in situ* sur embryons entiers ont mis en évidence dès E9,5, une expression de *Dip2* restreinte au système nerveux central et aux organes sensoriels. D'autres analyses menées par les mêmes auteurs suggèrent que *Dip2* aurait un rôle dans la compartimentation des différentes régions du SNC (Mukhopadhyay *et al.* 2002).

Le gène *S100B* code pour une protéine liant le calcium et impliquée dans divers processus biologiques notamment au niveau du cerveau (Nishiyama *et al.* 2002), l'apoptose et le développement de certains cancers (Fernandez *et al.* 2005).

Enfin, le gène *MCM3AP* (MCM3-associated protein) code pour une protéine qui interagirait avec des récepteurs aux glucocorticoïdes (Osman *et al.* 2006) et serait impliquée dans la prolifération des lymphocytes B, dans la réponse aux antigènes dépendant des cellules T, ou encore dans la lymphogénèse (Kuwahara *et al.* 2002, Fujimura *et al.* 2005).

Malgré les efforts considérables fournis par la communauté scientifique quant au séquençage et à l'identification de gènes candidats, six gènes portés par la région *Prmt2-Col6a1* restent inconnus.

B. Induction de la délétion *Prmt2-Col6a1* in vivo

Aujourd'hui, il est possible de générer de grandes duplications, délétions, inversions et translocations ciblées dans le génome de la souris, en utilisant la technologie des cellules embryonnaires souches (ES) et le système de recombinaison homologue *Cre/loxP* (*in vitro* ou *in vivo*) (Hérault *et al.* 1998 ; Brault *et al.* 2006).

Dans le cas de la création de la délétion de la région *Prmt2-Col6a1*, la stratégie TAMERE (Transallelic targeted meiotic recombination) a été privilégiée. Ce protocole permet d'induire des réarrangements chromosomiques de grande taille avec une efficacité d'environ 10%, ce qui en fait un outil puissant (Hérault *et al.* 1998). La lignée ainsi générée a été nommée Ms1Yah.

C. Analyse phénotypique de la lignée Ms1Yah

Contrairement aux deux autres modèles murins de M21 (Ms1Rhr et Ms1Cje décrits précédemment), qui présentent de sévères phénotypes, ces individus ne présentent aucune anomalie morphologique ou comportementale majeure. Les gènes de cette région ne sont donc pas suffisants pour induire les caractéristiques observées dans la M21 chez l'homme, ils sont cependant requis pour les stades de développement précoce de l'embryon, puisque aucun embryon nullisomique n'a été observé après 3,5 dpc (stade d'implantation dans l'utérus). Toutefois, la stimulation du système inflammatoire par application locale ou systémique de LPS entraîne une augmentation générale de la réponse immunitaire. Cela se traduit entre autres par une augmentation du nombre de neutrophiles recrutés dans les poumons (*Figure 14 A*), ainsi que par une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF- α comparé aux sauvages. De plus, l'instillation de LPS entraîne une détresse respiratoire bien inférieure à celle observée chez les contrôles (*Figure 14 B*).

L'analyse, par PCR Quantitative (Q-PCR) de l'expression des gènes de la région a permis de mettre en évidence des gènes sensibles au nombre de dose, dont l'expression est modifiée par le LPS. Les cinq gènes *S100b*, *Dip2*, *Pcnt2*, *Q9D5N2* et *Q9D0B9*, apparaissent comme étant dose sensible dans des poumons traités et non traités, alors que pour *Prmt2*, *Mcm3ap*, *Col6a2* et *C21orf57*, l'influence du dosage génétique sur l'expression semble dû à l'action du LPS. Des six gènes de la région exprimée dans les macrophages, quatre étaient dosage sensible sans changement d'expression (*Prmt2*, *Pcnt2*, *Mcm3ap*) ou down-régulé (*Lss*) après traitement de LPS (Besson *et al.* 2007).

De façon générale, la réponse aux LPS dans des poumons et les macrophages est complexe. Plusieurs gènes de la région *Prmt2-Col6a1* sont sensibles au nombre de copies dans le poumon et les macrophages, et participent probablement aux phénotypes observés chez les souris de Ms1Yah.

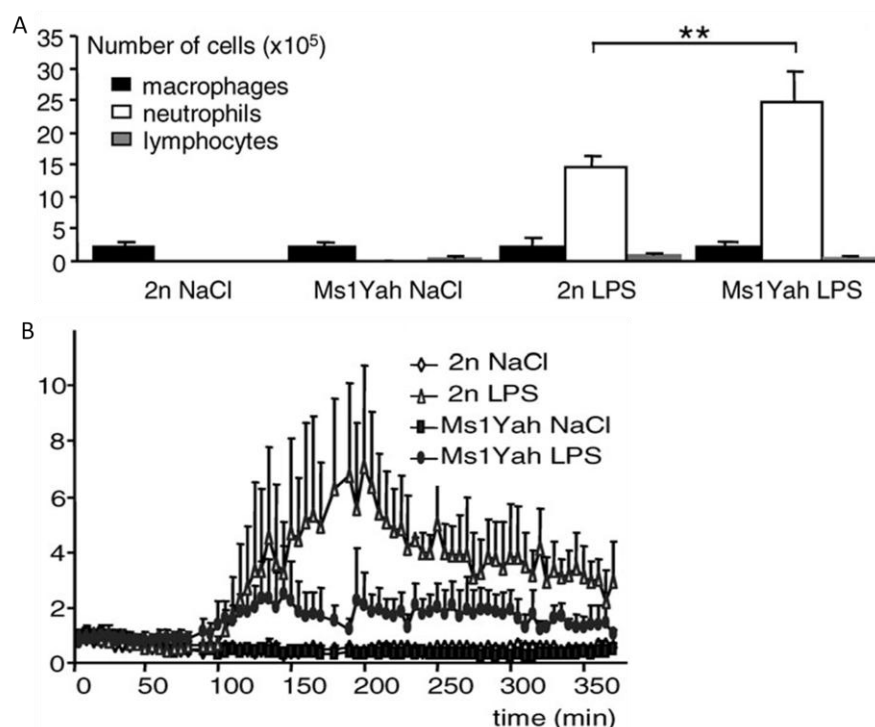


Figure 14: Réponse inflammatoire et bronchoconstriction chez les souris Ms1Yah. Le nombre de neutrophiles recrutés après stimulation LPS est plus important chez les Ms1Yah que chez les sauvages (A), alors que la bronchoconstriction est fortement diminuée (B). tiré de Besson et al. 2007.

D. Les gènes candidats

De part leurs fonctions, deux gènes de la région *Prmt2-Col6a1* semblent particulièrement intéressants à étudier pour expliquer les phénotypes d'augmentation de la réponse immunitaire et de diminution de la bronchoconstriction en réponse au LPS.

1. Le gène *Prmt2*

La famille des protéines arginine-méthyltransférase (Prmts) regroupe les protéines possédant un domaine méthyltransférase putatif qui modifie la chromatine et régule la transcription. La protéine Prmt2 a été découverte chez l'homme en 1997 et est localisée en 21q22.3. Elle présente 60% de similitude avec la protéine HMT1 de levure mais n'a cependant pas d'activité méthyltransférase claire. L'analyse, par Northern blot, de

l'expression de la protéine montre qu'elle est présente de façon ubiquitaire mais, que son expression varie d'un tissu à l'autre (Scott *et al.* 1998).

Les travaux de Yoshimoto *et al.* (2006) décrivent l'implication de *Prmt2* dans la régulation du cycle cellulaire. Ils montrent en effet que la protéine Prmt2 interagit, via son domaine AdoMet (AdoMet, S-adenosyl methionine binding motif) avec la protéine du rétinoblastome (RB). Prmt2 forme donc un complexe tertiaire avec le facteur de transcription E2F1, en présence de RB, et inhibe ainsi l'activité transcriptionnelle de E2F1.

Le rôle de *Prmt2* qui m'intéresse le plus a été décrit par Ganesh *et al.* (2006). En effet, ces travaux montrent que Prmt2 est la seule protéine de la famille à inhiber la transcription NF- κ B dépendante, et cela de façon dose dépendante. L'inhibition de la transcription NF- κ B a lieu grâce à une accumulation de l'inhibiteur I κ B- α dans le noyau. Cela conduit à une réduction du nombre de molécules NF- κ B liant l'ADN et donc à une diminution de la transcription NF- κ B dépendante. Prmt2 intervient dans ce processus en interagissant avec I κ B- α via le domaine ankyrine et permet une accumulation de I κ B- α dans le noyau en inhibant l'export nucléaire de I κ B- α via la signalisation CRM1/LMB. Les auteurs décrivent entre autre que des MEFs (mouse embryo fibroblasts) KO pour *Prmt2* possèdent une quantité réduite de I κ B- α nucléaire et une augmentation de la transcription NF- κ B dépendante.

Cette dernière fonction de *Prmt2* m'a permis d'émettre l'hypothèse que la diminution du nombre de dose de ce gène, dans le modèle Ms1Yah serait à l'origine de l'augmentation de la réponse immunitaire observée dans ce modèle. En effet, l'expression des pro-cytokines inflammatoires IL-6 et TNF- α sont NF- κ B dépendante et augmente chez les souris Ms1Yah suite à la stimulation LPS.

2. La lignée murine *Prmt2*^{tm1Enbl}

Afin de valider cette hypothèse, j'ai obtenu la lignée *Prmt2*^{tm1Enbl}/*Prmt2*^{tm1Enbl}, générée par le groupe de E. Nabel (le synonyme de cette lignée est *Prmt2*^{-/-} et sera utilisé par la suite pour une meilleure compréhension).

Les souris *Prmt2*^{-/-} ont été obtenues par recombinaison homologue. Un vecteur ciblant *Prmt2* a été construit en remplaçant une partie de l'exon 4, 6 et tout l'exon 5 avec une cassette de résistance à la néomycine en antisens (*Figure 15*). Une mutation ponctuelle, produisant d'un codon non-sens, a été introduite à la Gly119, de sorte que les ARN transcrits à partir de l'allèle mutant ne codent ni le domaine de liaison AdoMet, ni le domaine C-terminal. La recombinaison homologue a été confirmée par Southern blot et PCR. Le Northern blot n'a pas permis de détecter de transcrit chez ces souris. Les souris *Prmt2*^{-/-} sont viables et naissent avec une distribution mendélienne normale. Aucune anomalie morphologique ou histologique n'a été observée (Yoshimoto *et al.* 2006).

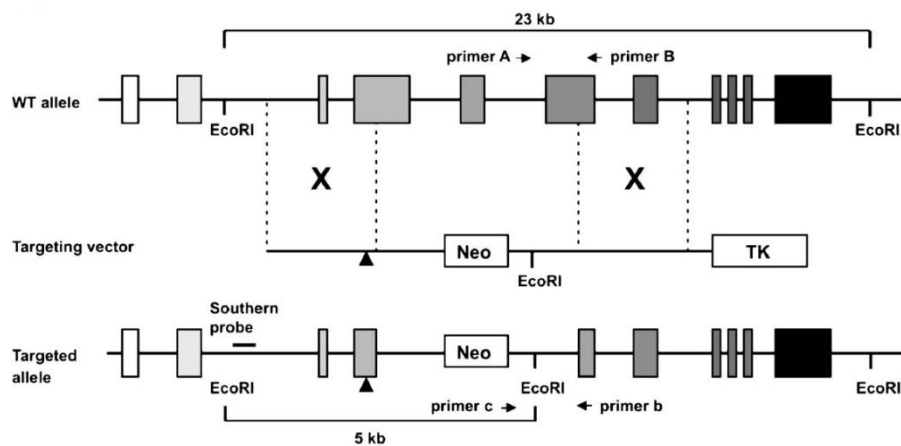


Figure 15: Représentation de la recombinaison homologue entre le vecteur cible et le gène Prmt2. Le codon non-sens introduit à la Gly119 est symbolisé par le triangle noir. Tiré de Yoshimoto et al. 2006.

3. Le gène *S100B*

i. La famille de protéines *S100*

Le gène *S100B* code une protéine appartenant à la famille des protéines S100 qui regroupent 25 membres liant le calcium. Elles sont constituées de deux boucles E et F, de quatre hélices α , d'une région centrale de taille variable ainsi que des domaines C et N-terminaux. Les protéines S100 n'ont pas d'activité catalytique propre. Sous l'effet de la liaison au calcium, la structure des hélices est modifiée et révèle ainsi le site de liaison à la protéine cible (Marenholz *et al.* 2004). La famille compte actuellement 23 membres chez

l'homme. Les protéines S100A sont regroupées en cluster sur le chromosome 1, ce qui n'est pas le cas de S100B. La plupart de ces protéines ont un orthologue chez la souris (Table 4).

gène	Localisation chromosomique	Orthologue murin	Localisation chromosomique
S100A1	1q21	S100a1	3F1
S100A2		Mm33816	
S100A3		S100a3	
S100A4		S100a4	
S100A5		S100a5	
S100A6		S100a6	
S100A7		LOC381493	
S100A7L2			
S100A7L3			
S100A7L4			
S100A8		S100a8	3F2
S100A9		S100a9	
S100A10		S100a10	3F2
S100A11		S100a11	3F2
S100A12		(S100a12)*	3F1
S100A13		S100a13	3F1
S100A14		S100a14	3F1
S100A15	21q22		
S100A16		230000L21Rik	3F1
S100B	4p16	S100b	10C1
S100P	5q14	S100p*	5B2
S100Z	Xp22	LOC268686	13D1
CALB3		Calb3	XF4

L: Like; *structure du gène non intacte

Table 4 : Nomenclature et localisation des protéines de la famille S100 chez l'homme et la souris. Adapté de Marenholz et al. 2004.

Les protéines S100 exercent de nombreuses fonctions dans divers tissus, ce qui peut s'expliquer par :

- Le nombre de protéines de la famille (25).
- Certaines protéines S100 lient aussi les ions Cu^{2+} et/ou Zn^{2+} .
- Une distribution spatiale, intra et extra cellulaire spécifique.
- Leur possibilité à former des homo ou hétéro-dimères.

Les pathologies dans lesquelles l'expression des S100 est altérée peuvent être séparées en quatre groupes : les désordres neurologiques, les cancers, les pathologies cardiaques, et l'inflammation (Sedaghat et Notopoulos, 2008).

S100B (homodimère de la sous unité S100 β) est une petite protéine de 21kD codée par le bras long du HSA21 (21q22.3). Elle possède à la fois une action neurotrophique positive (à faible concentration) et neurotoxique (à forte concentration).

Elle a d'abord été décrite comme étant produite par les astrocytes dans le système nerveux central. En effet une augmentation de son expression dans les astrocytes est une caractéristique de leur activation (Steiner *et al.* 2007). La sécrétion de S100B est un phénomène primaire lors de la réponse gliale contre les dommages métaboliques (privation d'oxygène...) (Gerlach *et al.* 2006). Les lésions au cerveau sont caractérisées par une augmentation de la concentration en S100B dans le sang. Toutefois, l'utilisation de cette caractéristique dans le diagnostic des lésions cérébrales est controversée (Biberthaler *et al.* 2006 ; Muller *et al.* 2007).

S100B est aussi exprimé au niveau du poumon, dans les cellules dendritiques interstitielles et dans les nerfs péri-bronchiaux, et le nombre de cellules qui expriment S100B augmente lorsqu'il y a inflammation du poumon (Morbini *et al.* 2006).

Différents cancers ont montré une modification de l'expression de S100B, notamment dans le mélanome. Dans ce cancer, la concentration sérique de S100B est un bon marqueur de la différenciation et de la prolifération des cellules cancéreuses.

De plus, S100B est impliqué dans l'inflammation puisqu'il induit une surexpression de la COX-2 qui est une enzyme responsable de l'état d'inflammation. La protéine S100B stimule l'inflammation par l'activation de la voie NF- κ B via le récepteur RAGE (Donato *et al.* 2009).

ii. RAGE

RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts) fait partie de la superfamille des immunoglobulines de surface cellulaire. Il est codé par la classe III du complexe majeur d'histocompatibilité. Le récepteur est constitué d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'une queue cytosolique essentielle à la signalisation intra cellulaire résultant de l'activation de RAGE (Schmidt *et al.* 2000). C'est un récepteur qui lie de nombreux ligands comme les AGEs (Advanced Glycation Endproducts), certains membres de la famille S100, l'amphotérine les feuillet β -amyloïdes, la protéine HMGB1...

RAGE est exprimé de façon constitutive durant le développement, puis son expression est restreinte à certains tissus à l'âge adulte. On retrouve donc RAGE au niveau du système

nerveux (astrocytes) (Sasaki *et al.* 2001), dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (Brett *et al.* 1993). Cependant, son expression est plus importante dans le poumon où on le retrouve dans les pneumocytes alvéolaires de type I (Dahlin *et al.* 2004) et II, dans les macrophages (Cheng *et al.* 2005) ainsi que dans les cellules de l'épithélium bronchique (Morbini *et al.* 2006).

La liaison du ligand à RAGE induit une cascade de signalisation entraînant l'activation de NF- κ B, induisant la mise en place du processus d'inflammation (Chavakis *et al.* 2004). De plus, le LPS induit l'expression de RAGE dans l'espace broncho-alvéolaire (Uchida *et al.* 2006). Il faut remarquer qu'en absence de stimuli, RAGE est exprimé à un niveau basal faible qui augmente fortement lors de l'inflammation, là où les ligands de RAGE s'accumulent (Schmidt *et al.* 2001).

iii. La signalisation S100B-RAGE-NF κ B

Parmi les protéines de la famille S100, huit n'interagissent pas avec RAGE, trois pourraient se lier à RAGE et neuf sont connues pour être des ligands de RAGE. Parmi ces dernières, on trouve S100B.

La liaison de S100B à RAGE active les cellules endothéliales et musculaires du poumon, les monocytes ainsi que les lymphocytes T, ce qui entraîne la production des cytokines et des molécules d'adhésion pro-inflammatoires (Yan *et al.* 2003 ; Hofmann *et al.* 1999). De plus, cette liaison entre S100B et RAGE augmente l'adhérence des monocytes aux cellules du muscle lisse de façon NF- κ B dépendante. L'activation de RAGE par S100B active la sensibilité des neutrophiles aux molécules chimio attractives (Donato *et al.* 2009). Sachant que la concentration en S100B et RAGE augmentent aux sites d'inflammation, S100B participerait donc à l'activation des macrophages et au recrutement des neutrophiles au site de l'inflammation (*Figure16*, tirée de Donato *et al.* 2009)

L'ensemble de ces données bibliographiques suggèrent un rôle de S100B dans l'inflammation. Sa liaison à RAGE, induit entre autres l'expression des gènes de l'inflammation via le facteur NF- κ B.

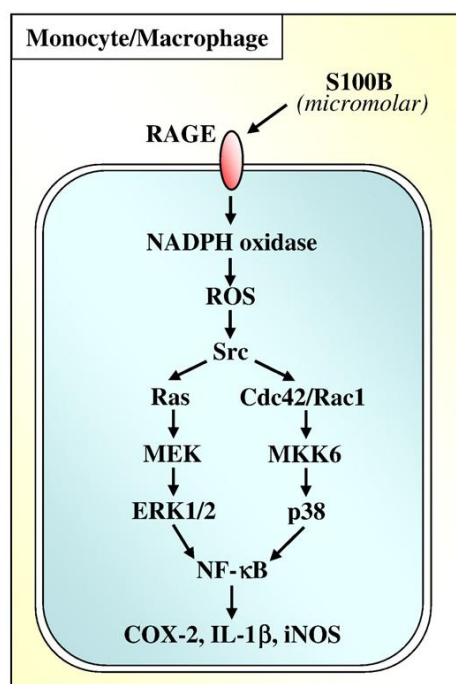


Figure 16: modèle proposé par Donato et al. (2009) pour l'activation des monocytes par la voie S100B-RAGE-NFκB.

4. La lignée *S100b*^{tm1Daoh}

Ayant émis l'hypothèse que la voie de signalisation NF-κB serait dérégulée dans le modèle murin Ms1Yah, il serait intéressant d'étudier l'implication de *S100B* dans le phénotype d'inflammation pulmonaire du modèle Ms1Yah. Dans ce but, l'équipe s'est procuré la lignée *S100b*^{tm1Daoh} (le synonyme de cette lignée est *S100B*^{-/-} et sera utilisé par la suite pour une meilleure compréhension) (Xiong et al. 2000).

Cette lignée a été générée par recombinaison homologue par le groupe d'A. Marks. Le gène *S100B* est composé de trois exons. Le vecteur utilisé possède l'exon 1, l'exon 2 est remplacé par une cassette néomycine, alors que l'exon 3 est flanqué d'une cassette TK (tyrosine kinase) qui permet de sélectionner les clones recombinants. Après recombinaison, l'exon 2 du gène *S100B* sauvage est remplacé par la cassette néomycine, ce qui abolit l'expression du gène (Figure 17). La recombinaison entre le vecteur et le locus sauvage a été vérifiée par Southern blot. Les animaux *S100B*^{+/-} ainsi obtenus ont été croisés entre eux pour obtenir les animaux *S100B*^{-/-} avec une transmission de 25%. L'absence de transcrit et de protéine *S100B* chez les souris *S100B*^{-/-} a été vérifiée par northern et western blot. La lignée *S100B*^{-/-} n'a pas révélé d'anomalies morphologiques ni de malformation d'organes à l'autopsie (Xiong et al. 2000).

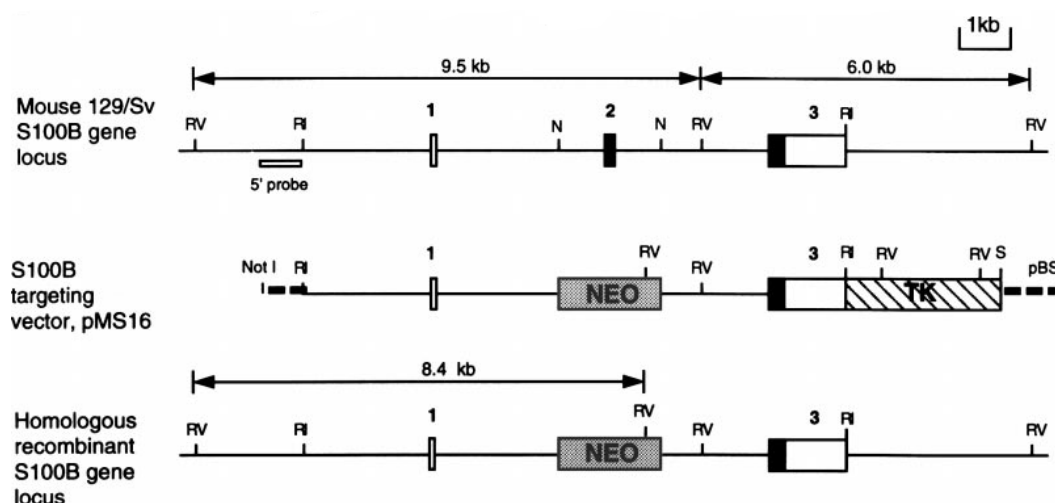


Figure 17: Structure de l'allèle *S100B* sauvage, du vecteur cible et de l'allèle *S100B* recombiné. Tiré de Xiong et al. 2000.

V. Projet de recherche

La trisomie 21 est une maladie multigénique et actuellement, aucun des modèles murins de trisomie ou de monosomie développés (Ts65Dn, Ts1Cje, Tc1, Ts1Yu...etc.) ne présente toutes les anomalies visibles chez les patients.

Ce projet vise à identifier les gènes sensibles à un effet de dose qui jouent sur l'apparition éventuelle d'anomalies et de déterminer s'il existe des interactions entre les différentes régions homologues du chromosome 21 humain. Dans ce but, le laboratoire a développé un ensemble de modèles murins de trisomie et monosomie pour différentes régions homologues au HSA21. Parmi ces modèles, la lignée Ms1Yah présente une altération de la réponse inflammatoire et de la bronchoconstriction après stimulation par le LPS (Besson *et al.* 2007).

L'objectif de mon travail de thèse a été d'identifier le(s) gène(s) à effet de dose, intervenant dans la mise en place des phénotypes induit par le LPS chez la lignée Ms1Yah.

Dans ce but, j'ai d'abord étudié l'expression des gènes de la région *Prmt2-Col6a1*, dans les poumons et les macrophages, afin de déterminer les gènes sensibles aux effets de dose et dont l'expression est modifiée après stimulation par le LPS. Ainsi, de part leurs fonctions, deux gènes m'ont semblé particulièrement intéressants : *Prmt2* et *S100B*.

En étudiant la réponse inflammatoire et la bronchoconstriction chez les lignées *Prmt2*^{+/-} et *S100B*^{+/-}, j'ai pu montrer que ces gènes sont respectivement impliqués dans l'augmentation de la réponse inflammatoire et dans la diminution de bronchoconstriction observées chez les Ms1Yah.

Puis, afin d'essayer de mieux comprendre le rôle de *S100B* dans la bronchoconstriction j'ai étudié la localisation de la protéine, par marquage en immuno-marquage.

Enfin, la diminution de la bronchoconstriction chez la lignée *S100B*^{-/-}, m'a permis de démontrer que la protéine S100B participerait au contrôle de la fonction respiratoire. Afin de tester cette hypothèse, j'ai utilisé un anticorps anti-S100B dans le modèle C57BL/6J stimulé au LPS. La diminution de bronchoconstriction observée chez ce modèle laisse entrevoir le pouvoir thérapeutique d'une telle action. Ainsi, l'action de l'anticorps anti-S100B est actuellement testée dans un modèle murin d'asthme utilisant la lignée BALB/cJ.

Matériels et Méthodes

I. GENOTYPAGE

A. Extraction d'ADN génomique

La lyse enzymatique est réalisée à partir d'un morceau de queue d'environ 5 mm, placée à 56°C pendant une nuit, dans un tampon d'extraction avec de la protéinase K à 5mg/ml (Biofidal, Réf. GX03020). Le lendemain, le mélange est mixé 5 min puis les protéines sont précipitées avec une solution de NaCl 6 M (V/V = 1/3) et une centrifugation de 10 min à 13000 rpm. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube contenant de l'isopropanol (V/V = 2/3). L'ADN est précipité et culotté par une centrifugation de 1 min à 13000 rpm. Les sels sont alors éliminés par deux lavages successifs à l'éthanol 70%. Le culot d'ADN est séché à température ambiante puis dissout dans du TE en l'incubant 1 à 2 heures à 65°C.

B. La méthode de Southern Blot

La méthode de Southern est une technique de détection spécifique de fragments d'ADN, transférés sur membrane, par hybridation à une séquence complémentaire marquée ou sonde.

1. Réalisation d'une sonde marquée à la digoxigénine

i La Réaction de polymérisation en chaîne

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est utilisée pour synthétiser les sondes de criblage génomique. Cette technique est basée sur l'amplification d'un fragment d'ADN à l'aide d'amorces. Les amorces ou oligonucléotides sens et anti-sens, utilisés pour la fabrication de la matrice, sont répertoriés dans la table 4. Le milieu réactionnel de PCR utilisé contient entre 50 et 150 ng d'ADN génomique pour Ampicilline, 0,2 µM et 0,5 µM d'amorces sens et anti-sens, 0,2 mM de dNTPs et 1U de Taq ADN polymérase (5Prime Dutcher Réf. 033783) avec son tampon d'activité (contenant du MgCl₂). La réaction de PCR est également décrite pour chacun des fragments d'ADN amplifiés.

La sonde Cre est synthétisée à partir d'un plasmide : pBN-Cre. Il est digéré par les deux enzymes de digestion BamHI/HindIII, pour donner un fragment de 800pb qui servira, après purification, de matrice au marquage à la digoxigénine.

Oligonucléotides	Concentration (μM) et T_m ($^{\circ}\text{C}$)	Programme PCR	Taille de la sonde
Ampi 5'-TCTTAGACGTCAGGTGGCAC-3' 5'-CTCACGTTAAGGGATTTGGTC-3'	0,2 μM et 58 $^{\circ}\text{C}$	5 min à 95 $^{\circ}\text{C}$ 30s à 95 $^{\circ}\text{C}$ 45s au T_m 45s à 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min à 72 $^{\circ}\text{C}$	1120 pb

Table 5: Sondes d'ADN marquées à la digoxigénine utilisées pour la méthode de Southern. Les amorces utilisées, leurs températures d'hybridation (T_m en $^{\circ}\text{C}$), leurs concentrations (μM) ainsi que le programme de PCR et la taille des fragments obtenus (pb) sont exposés.

ii Purification de la matrice d'ADN

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

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

Le marquage des sondes se fait à partir de 1 à 3 μg d'ADN matrice, dénaturé 10 min dans un bain-marie à 100 $^{\circ}\text{C}$. Le tube est alors immédiatement plongé dans la glace 1 min avant usage. Le volume réactionnel peut varier de 100 à 150 μl . La matrice est marquée avec le mélange réactionnel du kit Roche Molecular "DIG DNA Labelling kit" (Roche, Réf. 1277065), un mix d'hexanucléotides (Roche, Réf. 1277081) ainsi que la DNA polymérase de Klenow à 100U/ml (Biolabs, Réf. M0210L) pendant 20 h d'incubation à 37 $^{\circ}\text{C}$. La réaction est stoppée avec de l'EDTA (20mM), et le tube est chauffé 10 min à 65 $^{\circ}\text{C}$.

iv Purification de la sonde sur colonne G50 sephadex

La sonde marquée est purifiée sur colonne d'exclusion G50 sephadex (GE Healthcare Réf. 17-0573-01) qui permet d'éliminer les oligonucléotides non incorporés.

L'extrémité d'une seringue de 1ml est bouchée avec de la laine de roche, elle est ensuite placée dans un tube de 14 ml à fond rond. La seringue est remplie avec la solution de résine G50 sephadex et centrifugée 2 min à 800 rpm. Les deux étapes précédentes sont renouvelées jusqu'au remplissage complet de la seringue. La colonne est rincée avec 1 ml de STET et centrifugée 2 min à 800 rpm. La seringue est ensuite placée dans un nouveau tube propre. Du STET est ajouté si besoin à la solution de sonde marquée pour compléter le volume à 150 µl avant de déposer le tout sur la colonne G50 sephadex. La colonne remplie est centrifugée 2 min à 800 rpm puis rincée avec 150 µl de STET et à nouveau centrifugée 2 min à 800 rpm. Environ 280 µl de solution de sonde marquée purifiée sont ainsi récupérés.

v Dosage de la sonde par immunoblotting

La quantité de sonde marquée à la DIG est évaluée avec un anticorps anti-DIG.

Un ADN contrôle "DIG DNA labeled control" (Roche, Réf. 1585738) à la concentration initiale de 5ng/µl, est dilué en série parallèlement à la sonde à doser. Chacune des dilutions est déposée sur une membrane de nitrocellulose avant d'être fixée par cuisson 30 min à 80°C. La membrane est ensuite lavée dans du tampon I + tween, puis incubée 30 min avec du tampon I contenant 1 % d'une solution de blocage (Blocking Reagent, Roche, Réf. 1096176). La membrane est mise en contact 30 min avec l'anticorps (Roche, Réf. 1093274) dilué au 1/30000ème dans du tampon I + solution de blocage. Ensuite, elle est lavée de nouveau dans du tampon I + tween avant d'être rééquilibrée dans du tampon III. La révélation de l'anticorps se fait avec une solution de NBT/BCIP (Roche, Réf. 1681451) pendant une nuit à l'obscurité. Après avoir rincé la membrane, la concentration de la sonde marquée est déterminée visuellement par comparaison avec la concentration connue de l'ADN contrôle.

2. Digestion enzymatique d'ADN génomique et transfert sur membrane de nitro cellulose

L'ADN génomique (10µg) est digéré en présence de 10 U d'enzyme dans le tampon relatif à celle-ci à la concentration de 1X additionnés de spermidine (Sigma, Réf. S0266 2mM). Le mélange de digestion est incubé une nuit à la température relative à l'enzyme (généralement 37°C). Après digestion, l'ADN est séparé par électrophorèse sur gel d'agarose

à 0,7%. Cette digestion d'ADN est ensuite visualisée et photographiée sur une plaque UV équipée d'une caméra de type ST50 Biocapt (Fischer Bioblock Scientific).

L'ADN contenu dans le gel est dénaturé 20 min dans le tampon de transfert A sous faible agitation. Ce tampon est ensuite retiré et le gel d'agarose rincé à l'eau miliQ. Le gel est neutralisé dans deux bains successifs de tampon de transfert B qui sont effectués respectivement pendant 30 et 15 minutes, sous faible agitation. Les fragments d'ADN sont alors transférés sur la membrane de nitrocellulose (Hybond N, Amersham Réf. RPN203N), par capillarité sur la nuit, avec une solution de SSC 10X pH = 7. Le lendemain, l'ADN est fixé 3 heures à 80°C.

3. Hybridation et révélation de la sonde marquée

La membrane de nitrocellulose est réhydratée dans du NaPi 500 mM pH = 7,2, avant d'être placée dans un tube à hybridation avec 30 ml de tampon Church à 65°C, pendant 30 min dans un four à hybridation maintenu à 68°C.

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

Pour la révélation de la sonde avec l'anticorps anti-DIG, la membrane est lavée deux fois 5 min dans du tampon de lavage Church à 65°C, puis dans un tampon I + tween. La membrane est ensuite placée dans 20ml tampon I contenant 1% d'une solution de blocage pendant 30 min. Puis la membrane est incubée 30 min avec l'anticorps dilué au 1/30000ème dans du tampon I + solution de blocage 1%. La membrane est lavée de nouveau dans du tampon I et 0,3 % tween, puis rééquilibrée dans du tampon III avant la détection de l'anticorps avec une solution de CDP-Star (Roche, Réf. 1685627). La réaction de chimioluminescence est détectée sur un film d'autoradiographie (Kodak Réf. V1651512) après 2 à 4 heures d'exposition.

4. Ré-hybridation de la membrane de nitrocellulose

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

C. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La réaction de polymérisation en chaîne permet d'amplifier le nombre de copies d'une séquence d'ADN spécifique, à partir de la séquence des paires de base de chaque extrémité de cette séquence cible.

Les amorces ou oligonucléotides sens et anti-sens, utilisées pour amplifier les séquences d'intérêt dans les lignées *Prmt2*^{+/-} et *S100B*^{-/-}, sont répertoriées dans la table 6. Le milieu réactionnel de PCR utilisé contient entre 50 et 150 ng d'ADN génomique, 0,3µl d'amorces (10 µM) sens et anti-sens, 0,3µl de dNTPs (10mM), 0,2µl de Taq ADN polymérase (2U) (5Prime Dutcher Réf. 033783) avec 10µl de son tampon d'activité (sans MgCl₂). La réaction de PCR est également décrite pour chacun des fragments d'ADN amplifiés.

lignée	Couple d'amorces sens et anti-sens	Programme PCR	Taille du produit PCR (pb)
<i>Prmt2</i>^{+/-}	primer A 5' CTGAGGTATTACCAGCAGACA 3' primer B 5' CTCTCTGATGCAGGTCTAC 3' primer C 5' CCGGTGGATGTGGAATGTGT 3'	5min à 94c° 2min à 94c° 30s à 58c° 1.30min à 72c° 10 à 72c° } x 35	WT : 190 <i>Prmt2</i> ^{+/-} : 280
<i>S100B</i> allèle WT (+)	5'-GGGATGGCCACCCACAATGG -3' 5'-TCTGGTGGCTATTCCAATCCC-3'	5min à 94c° 30s à 94c° 30s à 55c° 2min à 72c° 10 à 72c° } x 35	400
<i>S100B</i> allèle nul (-)	5'-CCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGA-3' 5'-CGAGGAAGCGGTGAGCCCATTCGC-3'	30s à 55c° 2min à 72c° 10 à 72c° } x 35	550

Table 6: Lignées géotypées par la méthode de PCR.

Les amorces utilisées, le programme de PCR et la taille des fragments obtenus (pb) sont exposés. Le couple d'amorce A/B permet d'amplifier l'allèle sauvage de tandis que le couple B/C amplifie l'allèle muté du gène *Prmt2*. Les allèles sauvage et mutant du gène *S100B* sont déterminés par deux couples d'amorces différents, dans les mêmes conditions de PCR.

II. Prélèvements des cellules de la moelle osseuse et différenciation en macrophages

A. Prélèvement des cellules

Les macrophages ont un rôle majeur dans l'inflammation, puisqu'ils sont la source de production de cytokines inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF- α .

Les macrophages sont obtenus à partir de cellules de la moelle osseuse. Pour cela, la souris est euthanasiée par exposition au CO₂ puis, les fémurs sont prélevés en faisant attention à ne pas les endommager, afin d'une part de ne pas perdre de cellules, et d'autre part d'assurer une totale stérilité de la moelle osseuse. Les fémurs sont ensuite placés dans une boîte de Pétri avec du PBS 1X afin d'éviter qu'ils ne se dessèchent. La suite de l'expérimentation se déroule sous hotte. Une incision est réalisée dans l'os, du côté de la tête du fémur. Une seringue de 1ml est remplie de PBS 1X et l'aiguille de 25G est introduite dans le fémur, parallèlement au canal osseux, du côté du genou. L'extrémité incisée de l'os est immergée dans un tube à hémolyse contenant 1ml de PBS 1X. Le PBS contenu dans la seringue est refoulé rapidement. La pression exercée pousse la moelle osseuse en dehors du fémur. Elle sort sous la forme d'un petit filament rouge. Si elle n'est pas sortie du premier coup, l'opération est répétée en aspirant du PBS à travers l'os et le refoulant. La moelle osseuse des deux fémurs est récupérée dans un même tube. Ensuite, les agrégats cellulaires sont cassés par aspirations-refoulements dynamiques à travers l'aiguille. Lorsque la suspension cellulaire est homogène, on laisse les fragments d'os sédimenter pendant 5min. Le surnageant est prélevé et déposé dans un nouveau tube propre puis placé dans la glace.

B. Mise en culture et différenciation en macrophages

On réalise une dilution au 1/20 dans du Turk's (lyse les hématies) afin de compter les cellules sur hématimètre de Malassez. Les cellules sont mises en culture à raison de 1.10^6 cellules/boîtes 100mm, en présence de DMEM (Sigma-Aldrich) supplémenté par 20% de horse's serum et 30% de surnageant de culture de cellules L929. Ce dernier est obtenu à partir de la culture, au laboratoire des cellules L929, et sert comme source de Macrophages Colony-

Stimulating Factor (M-CSF). Sept jours après la mise en culture, les cellules sont observées au microscope. Normalement, la préparation cellulaire contient à ce stade environ 95% de macrophages. Le milieu de culture est aspiré et les cellules sont décollées en ajoutant 5ml de PBS 1X froid et 20min d'incubation. Les cellules sont ensuite récupérées par pipetages successifs et rassemblées dans un tube falcon, puis centrifugées 10min à 4°C à 1100rpm. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris dans 500µl de milieu de différenciation. Les cellules sont ensuite comptées de la même manière que décrite précédemment. De nouvelles boîtes sont ensemencées à raison de 1.10^6 cellules/boîtes 100mm, dans le même milieu de culture.

III. Induction de la réponse inflammatoire par le Lipopolysaccharide (LPS)

A. *In vitro*

Dix jours après la mise en culture, les macrophages sont stimulés avec le LPS afin d'induire une production de cytokines pro-inflammatoires. Pour cela, les macrophages sont décollés, centrifugés et comptés comme décrit ci-dessus. A ce stade, le milieu utilisé pour reprendre le culot est un milieu DMEM sans complément en horse's serum ni M-CSF.

1. Stimulation pour le dosage des cytokines

Afin de mesurer l'effet de la stimulation LPS sur les macrophages, je mesure les concentrations en IL-6 et TNF-α secrétées par ces cellules en réponse au stimulus. Pour cela, après comptage, les macrophages sont dilués à raison de 10^6 cellules/ml et 100µl de cette suspension est déposée dans un puits de plaque 96. Je réalise un dépôt en triplicat par souris. J'ajoute ensuite la solution de LPS (LPS de *E. coli*, serotype 055 : B5 à 100ng/ml) ou de NaCl pour les contrôles. Le lendemain les surnageants sont prélevés, aliquotés et stockés à -80°C en vue du dosage des cytokines.

2. Stimulation en vue de l'extraction d'ARN

Pour d'étudier l'impact de la stimulation LPS sur l'expression des gènes *IL-6*, *TNF- α* et des gènes de la région *Prmt2-Col6a1*, la quantité de cellules nécessaire est plus importante que pour le dosage des cytokines. Dans ce cas, les macrophages sont dilués à raison de 3.10^6 cellules/ml et 1ml de cette suspension est déposée dans un puits d'une plaque 6 puits. J'ajoute ensuite la solution de LPS (LPS de *E. coli*, serotype 0111 : B4 à 100ng/ml) ou de NaCl pour les contrôles et je complète à 2ml par du milieu. Le lendemain, les cellules sont lysées et l'ARN extrait.

B. In vivo

Dans un premier temps, j'ai porté mon intérêt sur des résultats obtenus *in vivo*, dans des modèles de stress inflammatoire pulmonaire induit par le LPS, chez des souris Ms1Yah, *Prmt2*^{+/-}, *S100B*^{+/-}, *S100B*^{-/-} ainsi que chez des contrôles B6. Les paramètres les plus intéressants, qui traduisent une inflammation pulmonaire sont la bronchoconstriction, la production des cytokines et chimiokines, le recrutement des neutrophiles ainsi que l'activité myéloperoxydase. L'étude des ces différents signaux de l'inflammation sera décrite plus tard.

Par ailleurs, afin de limiter le nombre d'animaux utilisés et de respecter les règles d'éthique, j'essaie de tirer un maximum d'informations de chaque souris.

1. Induction d'une réponse systémique

L'ensemble des souris utilisées pour l'expérimentation *in vivo* sont des mâles et sont âgées de 8 semaines $\pm$ 1 semaine.

i. La stimulation LPS

Les souris vigiles reçoivent 100 μ g de LPS (100 μ g dans 200 μ l de NaCl) (LPS de *E. coli*, serotype 055 : B5 à 100 μ g/ml) par injection intra-péritonéale. Ce mode d'injection

permettra d'induire une réponse systémique. Les souris contrôles reçoivent 200µl d'une solution saline contrôle stérile (NaCl).

ii. Les prélèvements

L'inflammation atteint un pic environ 1h30 après l'injection de LPS. Pour définir l'impact de la stimulation LPS sur la production de cytokines dans le sang, chez nos différents modèles, les souris sont sacrifiées 90min après l'injection. L'euthanasie est réalisée par asphyxie gazeuse en utilisant le dioxyde de carbone. L'animal est ensuite disséqué.

Le sang est prélevé par section de la veine cave. Par cette méthode environ 500µl de sang sont récupérés. Afin de récupérer le sérum, les tubes contenant le sang sont centrifugés 15min à 2000rpm à température ambiante. Le sérum, est ensuite aliquoté dans des nouveaux tubes propres et stockés à -20°C.

Ensuite, la cage thoracique est ouverte, et le poumon est lavé par injection de 10ml de PBS dans le ventricule droit du cœur. Le poumon se décolore en blanc. Le bloc cœur-poumon est ensuite prélevé, puis on sépare le poumon qui est stocké dans un tube plongé dans l'azote liquide. Ce poumon sera utilisé pour étudier l'expression des gènes cibles par Q-PCR.

2. Induction d'une réponse locale

i. La stimulation LPS

Ce type de stimulation consiste à administrer le LPS par instillation nasale. Cela nécessite l'anesthésie des souris. Les souris sont anesthésiées quelques minutes par injection, en intra-veineuse, de 100µl d'une solution de kétamine/xylazine (xylazine : 250µl, kétamine : 125µl, qsp 10ml de NaCl). Chez les souris B6, Ms1Yah, *S100B*^{+/-} et *Prmt2*^{+/-} aucun effet négatif lié à l'anesthésie n'a été observé. Cependant, les souris *S100B*^{+/-} ont montré une susceptibilité accrue à l'anesthésie. En effet, suite à une injection de 100µl de la solution anesthésique, environ une souris sur trois décède. En diminuant progressivement la dose, il apparaît que ces souris supportent une dose de 50µl sans effet sur leur survie.

Le sillon naso-labial est séché afin d'éviter la perte de LPS durant l'instillation. Le LPS est appliqué à l'entrée des voies aériennes supérieures à l'aide d'un cône effilé. Pour toutes les

souris pesant moins de 30g, je choisis d'administrer le LPS (LPS de *E. coli*, serotype 055 : B5 à 10µg/souris) dans un volume utile de 40µl. L'administration doit être rapide pour une bonne reproductibilité. L'animal est pris de soubresauts respiratoires caractéristiques, les membres se rétractent et on observe une augmentation rapide des mouvements respiratoires. Il peut arriver que la souris présente un arrêt respiratoire qui sera annulé par un léger massage de la cage thoracique. L'étude de l'impact de la stimulation LPS sur la fonction respiratoire, par pléthysmographie sera décrite dans un prochain paragraphe.

Lorsqu'il s'agit d'étudier l'impact de l'utilisation de l'anticorps anti-S100B (S-100β chain (N-15) Santa Cruz) sur la constriction des bronches, celui-ci est injecté en intra péritonéale, 16h avant la stimulation LPS, à raison de 2 mg/souris (Bozonovski *et al.* 2004).

ii. Les prélèvements

Les souris sont sacrifiées 24h après la stimulation LPS, de la même manière que décrite précédemment. Le sérum est récupéré de façon identique, afin de mesurer l'effet systémique induit par une application locale.

Le lavage bronchoalvéolaire (BAL) est réalisé après trachéotomie. Un cathéter relié à une seringue de 1ml est introduite dans la trachée. Je réalise ensuite 6 lavages (6x0,5 ml de NaCl) des parties aériennes des poumons afin de récupérer les médiateurs biologiques et cellulaires. Les trois premiers lavages sont regroupés, puis les trois derniers. Je choisis cette procédure car les premiers lavages sont plus concentrés en facteurs solubles. Ces lavages sont ensuite centrifugés 10min à 2000rpm à 4°C. Le surnageant des trois premiers lavages est ensuite aliquoté et stocké à -20°C pour effectuer le dosage des cytokines. Les culots (contenant les cellules) des différents lavages sont rassemblés pour chaque souris. S'il reste des hématies, elles sont lysées par ajout de 100µl d'eau. La lyse est stoppée par ajout de 1ml de NaCl 0,9%. Les cellules sont à nouveau centrifugées. Le surnageant est éliminé et les cellules sont reprise dans 400µl de NaCl. Une dilution au ¼ dans du bleu Trypan est réalisée afin de compter les cellules sur hématimètre de Malassez. Le bleu Trypan est un colorant d'exclusion qui permet d'identifier les cellules mortes (bleues) qui représentent, en général 5% des cellules présentes dans les BALFs. Les cellules sont diluées pour avoir 2.10^5 cellules/ml. 400µl de cette dilution est déposée sur lame histologique par centrifugation cytopspin puis colorées par la méthode de May-Grünwald Giemsa afin d'identifier les types cellulaires présents dans les BALFs. Ce comptage sera détaillé dans le paragraphe VI. C.

Le poumon est prélevé de façon identique à celle décrite précédemment. Dans ce cas, il sera utilisé pour réaliser un dosage de l'activité myéloperoxydase.

IV. Etude de l'expression des gènes *IL-6*, *TNF- α* et de la région *Prmt2-Col6a1*

Afin d'étudier l'impact de la stimulation LPS sur l'expression des gènes codant les cytokines *IL-6*, *TNF- α* , ainsi que sur l'expression des gènes de la région *Prmt2-Col6a1*, j'ai procédé en deux temps. Dans un premier temps les fémurs de 10 souris de chaque lignée (B6, Ms1Yah et *Prmt2*^{+/-}) ont été prélevés. Les macrophages obtenus ont été séparés en deux groupes de 5 souris pour chaque lignée. Un groupe a été stimulé par NaCl et l'autre par LPS comme décrit dans le paragraphe « induction de la réponse inflammatoire *in vitro* »

Pour l'étude de l'expression de ces mêmes gènes à partir des poumons, j'ai constitué deux groupes de n=5 souris pour les lignées B6, Ms1Yah et *Prmt2*^{+/-}. Ces groupes ont reçu pour l'un le LPS et l'autre le NaCl, comme décrit dans le paragraphe « induction d'une réponse systémique »

A. Extraction d'ARN

1. A partir des cellules

L'extraction est réalisée sous hotte, et les centrifugations à température ambiante.

Les cellules sont lysées 24h après la stimulation LPS. Pour cela, j'ai utilisé le RNeasy mini kit (Qiagen ref 74106). Les cellules sont lysées par ajout de tampon RLT (350µl) additionné de β -mercaptoéthanol (10µl/ml de tampon RLT). Les cellules sont décollées et lysées par homogénéisation à travers une seringue de 1ml avec une aiguille de 20G et transférées dans un tube de 1,5ml. Un volume d'éthanol (350µl) est ajouté et la solution est homogénéisée par pipetages successifs. Le mélange est transféré sur une colonne puis centrifugé 15sec à 13000rpm. L'ARN se fixe sur la membrane filtre de la colonne. Le liquide qui est passé à

travers la colonne est jeté. 700µl de tampon RW1 est ajouté à la colonne puis centrifugé à nouveau. Le liquide passé à travers la colonne est jeté. La colonne est transférée dans un nouveau tube de 2ml puis on ajoute 500µl de tampon RPE avant une nouvelle centrifugation. Le liquide passé à travers la colonne est jeté. Un dernier lavage de la membrane est réalisé par ajout de 500µl de tampon RPE avant une nouvelle centrifugation de 2min à 13000rpm, pour sécher la colonne. La colonne est transférée dans un nouveau tube de 1,5ml. On applique 50µl d'H₂O RNase free sur la membrane (sans la toucher avec le cône) afin d'éluer l'ARN lors d'une centrifugation 1min à 13000rpm. L'ARN est conservé à -80°C en attendant la réaction de reverse-transcription.

2. A partir des poumons

Les poumons provenant des souris ayant reçu le LPS en systémique sont pesés et un morceau de 30mg est prélevé. On attend environ 30µg d'ARN. Le morceau de poumon est déposé dans un tube de 15ml à fond rond et recouvert de tampon RLT (600µl) additionné de β-mercaptoéthanol (10µl/ml de tampon RLT). Le poumon est broyé, puis l'ARN est extrait de la même façon que décrite précédemment.

B. Mesure de la quantité et de la qualité de l'ARN extrait

1. Mesure de la concentration en ARN

La concentration en ARN est déterminée au spectrophotomètre Nanodrop (ND-1000). L'absorbance est mesurée à 460nm et est basée sur un coefficient calculé pour de l'ARN en solution dans l'eau. Les concentrations obtenues pour tous les échantillons sont comprises entre 600 et 2600ng/ml. Le Nanodrop permet aussi d'évaluer la pureté de l'ARN en comparant les ratios suivants :

- ✓ A260/A280 (A : Absorbance) : compris entre 1,9 et 2,1. Un ratio inférieur indique la présence de contaminants tels que les protéines.

- ✓ A260/A230 : $\approx 2,2$. Si inférieur à 1,7 indique la présence de contaminants tels le phénol/chloroforme, le trizol, le guanidium, les sucres, les lipides, les sels et l'EDTA.

2. Evaluation de la qualité de l'ARN

Afin de vérifier que l'ARN n'est pas dégradé, on utilise le Bioanalyseur Agilent 2000 (Agilent) qui analyse plus particulièrement la présence des ARN ribosomiaux 18S et 28S. Le protocole suivi est celui fourni par Agilent. Un ARN de bonne qualité est caractérisé par la présence de deux bandes sur le gel d'électrophorèse, une pour chaque ARNr. D'autre part, le ratio [28S/18S] doit être proche de 2 alors que le RIN (RNA Integrity Number) doit s'approcher de 10. Il est cependant relativement difficile de s'approcher de ces valeurs. En 2006, Fleige-Pfaffl et *al.* ont démontré qu'un ARN partiellement dégradé (ratio > 1,5 et RIN > 6) peu être utilisé sans influence pour les résultats de Q-PCR. Cela nous a permis de conserver tous les ARNs extraits dont le ratio le plus bas était 1,5 et le RIN le plus bas de 7.

C. La réaction de Reverse-Transcription (RT-PCR)

Avant de réaliser la mesure de l'expression des gènes par Q-PCR, il faut synthétiser l'ADNc. Pour cela, j'ai utilisé le kit superscript III RT-Kit (Fisher Invitrogen ref : 11752-250). Brièvement, le mix est préparé sur glace et comprend : 10µl du mix de réaction RT, 2µl de l'enzyme de RT, 1µg d'ARN et de l'eau qsp 20µl. La solution de réaction est incubée à 25°C pendant 10min puis à 50°C pendant 30min et finalement à 85°C pendant 5min. Les tubes sont immédiatement placés sur glace. 1µl (2U) de RNase H (*d'E. coli*) est ajouté puis les tubes sont incubés à 37°C pendant 20min. L'ADNc ainsi synthétisé peu être conservé à -20°C pour le court terme ou -80°C pour le long terme.

D. La Réaction de Polymérisation en Chaîne Quantitative (Q-PCR)

Afin d'évaluer l'expression des gènes d'intérêt, suite à une stimulation LPS ou NaCl, j'ai utilisé la technique de Q-PCR par SybrGreen. Les gènes suivants ont été testés : *IL-6*, *TNF- α* , *Prmt2*, *S100B*, *Pcnt2*, *Lss* et *Mcm3ap* (quantitect primer, Qiagen). Pour les gènes de

ménage qui serviront à normaliser les résultats, j'ai utilisé : *18S* (codant pour l'ARNr 18S, Eurogentec), *GAPDH* (quantitect primer Qiagen), *ActB* (ActineB, quantitect primer Qiagen), *$\beta 2m$* (quantitect primer Qiagen), *Pgk1* (quantitect primer Qiagen), *Rpl13a* (quantitect primer Qiagen), *Tbp* (quantitect primer Qiagen) et *Tub4* (Tubuline4, quantitect primer Qiagen).

Pour cela, les amorces de chaque gène sont testées avec un gradient de dilution (1/10 à 1/156250) d'ADNc pour déterminer la concentration d'ADNc pour laquelle l'amplification est la meilleure. Plusieurs critères entrent en compte :

- La fluorescence doit sortir avant 30 cycles d'amplification.
- La courbe d'efficacité doit être comprise entre 80 et 120%.
- Le Ct (nombre de cycle pour lequel la fluorescence passe au dessus du seuil de détection) soit le plus près possible de la courbe d'efficacité.

Les tests sont réalisés sur deux ADNc (un pour la condition LPS et l'autre pour le NaCL) des lignées suivantes : B6, Ms1Yah et Prmt2^{tm1Enbl}. Chaque réaction est réalisée en triplicat.

Excepté *Rpl13a* et *Tbp*, les autres paires d'amorces ont été testées avec succès, pour une efficacité comprise entre 80 et 120%, pour une dilution de 1/50 correspondant à 15ng d'ADNc.

Pour l'analyse, l'ADNc de tous les échantillons est donc dilué au 1/50. La réaction de Q-PCR a été réalisée avec 15ng d'ADNc soit 3 μ l, 200nM d'amorce, soit 1,5 μ l, 7,5 μ l de SybrGreen (quantitect SYBR Green PCR Kit, Qiagen) et 3 μ l d'H₂O, pour un volume total de 15 μ l. Chaque échantillon est analysé grâce au Stratagene Mx4000 avec une procédure d'amplification standard. Le niveau de transcription de chaque gène de ménage a été mesuré, pour chaque échantillon. Cela permet, d'une part de normaliser les valeurs obtenues pour les gènes d'intérêt, et d'autre part de corriger les variations de quantité d'ARN présentes dans le matériel de départ. Tous les échantillons ont été testés en triplicat et le résultat a été rapporté à la valeur moyenne des trois mesures. La normalisation a été réalisée grâce au logiciel GeNorm (Hellemans et al. 2007).

V. Mesure de la bronchoconstriction

Une partie de mon travail a porté sur la mesure de la fonction respiratoire de différentes lignées de souris, après instillation de LPS ou de solution saline contrôle, pour une période de

360min, à l'aide d'un pléthysmographe. Cet appareil permet de réaliser une mesure non invasive des paramètres respiratoires tels que le volume d'air inspiré et expiré ou volume courant (tidal volume), les temps correspondants, ou encore le temps de pause respiratoire (PenH).

Après induction de la réponse locale, comme décrit dans le paragraphe III A 1., l'animal est placé dans la chambre de mesure et le protocole informatique de mesure est lancé. Nous disposons de douze chambres individuelles de mesure (EMKA Technologies). Pour chaque expérience je traite 4 groupes de souris différentes avec n=3 souris par groupe. L'expérience est reconduite à l'identique jusqu'à n=10 souris par groupe stimulé au LPS et n=5 pour les groupe stimulés au NaCl. Les données étant reproductibles, celles issues de différentes expériences peuvent être regroupées.

La mesure dure 360min puisque la bronchoconstriction induite par le LPS débute entre 60 et 90min après l'instillation, atteint un pic avant de décliner jusqu'à un retour à la normale entre 4 et 6h en fonction de l'animal.

Le PenH peut être vu comme étant le changement de phase entre les courbes de flux thoracique et nasal. Une augmentation de ce paramètre corrèle avec une augmentation de l'obstruction bronchique.

Le PenH est calculé de la manière suivante : $\text{PenH} = (\text{Te}/\text{RT}-1) \times (\text{PEF}/\text{PIF})$ avec

- Te : le temps d'expiration
- RT : le temps de relaxation
- PEF : le pic de flux expiratoire
- PIF : le pic de flux inspiratoire

Les données sont analysées par le logiciel Datanalyst (EMKA Technologies) et représentées par la moyenne $\pm$ la déviation standard. Le test statistique utilisé pour analysé ces données est le test ANOVA (ANalysis Of Variance).

VI. Etude de la réponse inflammatoire

En dehors de la bronchoconstriction, l'inflammation des poumons peut entre autre être évaluée par le recrutement des neutrophiles, l'activité myéloperoxydase, la production de cytokines et chimiokines.

A. Le dosage des cytokines par la méthode ELISA

Deux des cytokines inflammatoires principales sécrétées en réponse à l'inflammation induite par le LPS sont l'IL-6 et le TNF- α . Leur concentration dans le sérum et le surnageant des BALFs est déterminée à l'aide du test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) en sandwich. Le protocole suivi est celui du fournisseur (RnD Systems pour TNF- α et IL-6, Abnova Human S100B ELISA Kit pour S100B). Brièvement, les puits d'une plaque 96 sont recouverts de 100 μ l d'anticorps dit de capture et incubée 2h à 37°C. La plaque est rincée deux fois au PBS/Tween 0,05% et une fois au PBS pour éliminer l'anticorps non lié. Les puits sont saturés avec une solution de PBS/BSA 1% pendant 2h à température ambiante. La plaque est rincée deux fois au PBS/Tween 0,05% et une fois au PBS.

La gamme étalon est répartie dans 8 puits. Cette gamme est réalisée avec une dilution en cascade (au $\frac{1}{2}$) à partir d'une solution à 2000pg/ml, elle servira à établir les concentrations en cytokines dans les échantillons.

Les échantillons de sérum sont dilués au quart dans chaque puits (25 μ l + 75 μ l de PBS/BSA 1%), alors que le surnageant des BALFs est utilisé pur. Les échantillons sont traités en duplicat. La plaque est incubée la nuit à 4°C. Les puits sont à nouveau rincés deux fois au PBS/Tween 0,05% et une fois au PBS. L'anticorps de détection est alors ajouté et incubé 2h à température ambiante. La plaque est rincée deux fois au PBS/Tween 0,05% et une fois au PBS. La streptavidine-HRP (HorseRadish Peroxydase) est diluée au 1/2000 dans du PBS/BSA1% avant d'être distribuée dans les puits. La plaque est incubée 30min à température ambiante et est à nouveau rincée deux fois au PBS/Tween 0,05% et une fois au PBS. Pendant ce temps un aliquot d'ABTS (chromophore substrat de la HRP) est décongelé et on y ajoute de l'H₂O₂ 3%. Cette solution est distribuée dans les puits rapidement et la plaque est placée à l'obscurité pendant 20 à 30min, le temps que la réaction colorimétrique se

passee. La densité optique (DO) de chaque puits est lue par le lecteur EL 800 (BIO-TEK INSTRUMENTS) à 405nm pour IL-6 et TNF- α et à 450nm pour S100B. La lecture est réalisée deux fois. Les concentrations données en pg/ml sont moyennées pour chaque individu pour par groupe de souris.

B. Le dosage de l'activité myéloperoxydase (MPO)

La MPO est une enzyme contenue dans les polynucléaires neutrophiles présents dans le parenchyme pulmonaire. Ces cellules étant recrutées durant l'inflammation induite par le LPS, le dosage de l'activité MPO est donc un facteur permettant de valider l'inflammation pulmonaire.

Le travail est réalisé sur glace, et les centrifugations à 4°C.

Les poumons sont placés dans un tube de 15ml à fond rond et recouverts de 1ml de PBS avant d'être broyés. Les broyats sont transférés dans des tubes de 2ml propres et centrifugés 10min à 10000 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot repris dans 1ML de PBS1X + HTAB 0,5% + EDTA 1mM avant d'être transféré dans un nouveau tube 15ml à fond rond puis à nouveau broyé. Le broyat est transféré dans des tubes de 2ml propres et centrifugés 10min à 10000 rpm. Dans un tube de 5ml, les réactifs sont ajoutés dans l'ordre suivant : 1ml de HBSS 1X, 200 μ l de tampon PBS1X + HTAB 0,5% + EDTA 1mM, 150 μ l de surnageant de poumon ou 150 μ l de tampon pour faire le blanc, 100 μ l de o-Dianisidine (1pastille dans 8ml d'H₂O) et 100 μ l d'H₂O₂ (16 μ l d'H₂O₂ 30% + 10ml d'H₂O). l' H₂O₂ et l'o-Dianisidine doivent être préparés extemporanément et protégés de la lumière.

Les tubes sont incubés 15min au bain-marie à 37°C, sous agitation. La réaction est stoppée par ajout de 100 μ l d'une solution d'azide 1%. La DO est mesurée à 460nm.

C. Le recrutement cellulaire dans les poumons

En absence de stimuli inflammatoire, la majorité des leucocytes présents dans les poumons sont des macrophages résidents alvéolaires. Ces cellules ont trois fonctions

principales : la sécrétion de cytokines, la coopération cellulaire (présentation d'antigène) et la phagocytose. Les monocytes sont identifiables à leur grande taille qui varie de 18 à 21µm avec un noyau arrondi. Ces cellules sont très déformables et le cytoplasme est clair et basophile.

Après stimulation par le LPS, le nombre de macrophage diminue et on assiste à un recrutement important des neutrophiles. Leur principale fonction est la phagocytose. Ils sont reconnaissables à leur noyau plurilobé (deux à cinq lobes en général) et sont généralement plus petits que les macrophages (12 à 14µm), le cytoplasme est clair et acidophile (Figure 18)

Dans tous les cas on retrouve des hématies en très grand nombre ainsi que des plaquettes. Ces cellules ne sont pas comptabilisées.

Afin de déterminée l'impact de la stimulation LPS sur l'inflammation des poumons de nos différentes lignées de souris, j'ai réalisé des différentiels cellulaires à partir des cellules pulmonaires déposées sur lames et colorées tel que décrit dans le paragraphe « induction d'une réponse locale » « les prélèvements ». Le comptage est réalisé sur 200 cellules au microscope optique avec un objectif à immersion au grossissement x100. Le nombre de neutrophile et de macrophage est ramené au nombre de cellule total contenu dans les BALFs, c'est à ce moment que les résultats prennent toute leur importance.

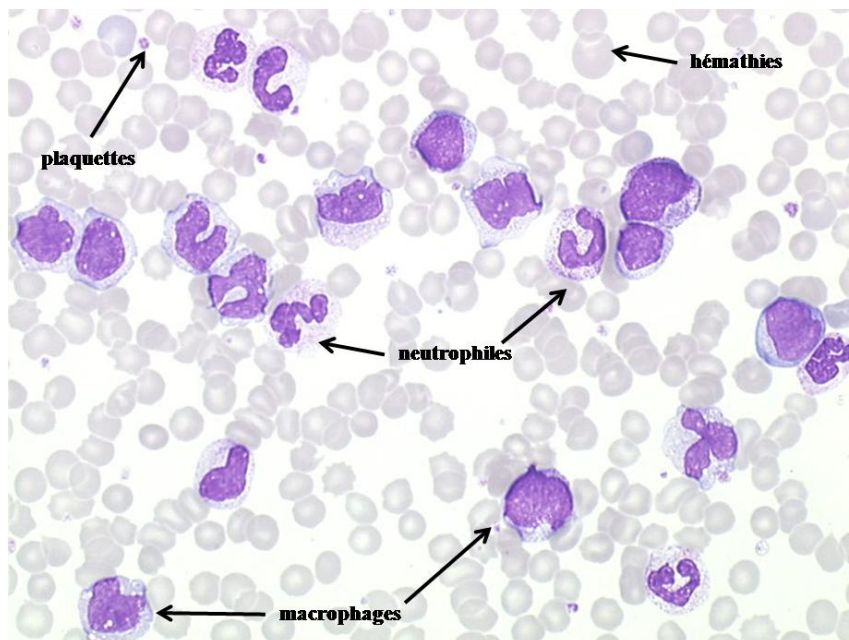


Figure 18: Neutrophiles et macrophages pulmonaires entourés de nombreux globules rouges et de quelques plaquettes.

VII. Etude de la localisation de la protéine S100B

Afin d'essayer de mieux comprendre le rôle de la protéine S100B dans l'inflammation et la bronchoconstriction, en collaboration avec le service d'anatomophysiologie de l'ICS (Strasbourg), nous avons réalisé un marquage de la protéine S100B à la fois en fluorescence et en chromogène.

Des souris B6 ont été stimulées localement avec du LPS ou une solution contrôle de NaCl 0,9% puis sacrifiées aux temps $t=0$, $t=2h$, $t=4h$ et $t=6h$ avec 3 souris par groupe/heure.

Les poumons sont d'abord insufflés avec de la PFA 4% au niveau la trachée avec une seringue 5 ml (aiguille bleue- 23 G). Puis ils sont fixés en PFA 4% minimum 16 H (max 24 H) et inclus en paraffine. Les coupes sont réalisées à 5 μm d'épaisseur.

Le début du protocole est le même pour les deux techniques de marquage. Les coupes sont hydratées dans l'eau avant d'être immergées dans une solution de Tris-EDTA + 0,05% Tween à 94°C pendant 40min puis ramenées à température ambiante pendant 15min. Elles sont ensuite lavées dans une solution de PBS + Tween 0,05% trois fois 5min. les sections sont isolées les unes des autres par un cercle au Dakopen. Le premier anticorps antiS100b (rabbit polyclonal Sigma ref HPA 015768) est dilué au 1/10000 dans du diluent DAKO, avant d'être déposé sur les sections et incubé sur la nuit à 4°C. Une section contrôle est gardée dans le diluent sans anticorps.

Le lendemain les lames sont lavées dans une solution de PBS + Tween 0,05% trois fois 5min. Ensuite les protocoles diffèrent :

➤ Pour le marquage CHROMOGENE :

Le second anticorps (biotynilated anti-rabbit –Elitz vectastain kit) dilué au 1/500 dans du PBS + Tween 0,05%, déposé sur les sections qui sont incubées 30min à température ambiante. Pendant ce temps, le complexe AB est préparé avec : 20 μl de solution A, 20 μl de solution B, 1ml de tampon de saturation et est conservé à l'abri de la lumière. La peroxydase endogène est inactivée par un bain de 5min dans de l'eau + H₂O₂ 3%. Les lames sont lavées dans une solution de PBS + Tween 0,05% trois fois 5min, puis le complexe AB est déposé sur les lames durant 30min à température ambiante. Les lames sont rincées dans une solution de PBS + Tween 0,05% trois fois 5min, puis dans le PBS et enfin dans l'eau. Le complexe DAB est composé d'une pastille d'urea, une pastille de DAB pour 1ml d'eau. La solution est déposée

sur les coupes et le marquage est contrôlé sous le microscope, 1min 30 sont suffisantes pour un bon marquage. Les lames sont rincées sous l'eau au robinet avant d'appliquer la solution HARRIS (pour la conservation du marquage) et les lames sont recouvertes d'une lamelle fixée à l'Eukitt.

➤ Pour le marquage FLUORESCENCE :

Le second anticorps (goat anti-rabbit- CY3) est dilué au 1/500 dans du PBS + Tween 0,05% avant d'être déposé sur les coupes et incubé 1h à température ambiante. Les lames sont rincées dans une solution de PBS + Tween 0,05% trois fois 5min une solution de Mowiol + DAPI (10µg/ml) est déposée. Les lames sont analysées par microscopie à fluorescence.

VIII. Le modèle d'induction de l'asthme

Durant mes travaux, j'ai pu constater qu'une injection de l'anticorps antiS100B 16h avant la stimulation LPS entraîne une diminution significative de la bronchoconstriction.

L'intérêt de ce modèle est de tester l'efficacité de l'anticorps anti-S100B sur la bronchoconstriction induite par la sensibilisation à l'ovalbumine et le challenge ovalbumin/métacholine.

Cette étude est réalisée sur la lignée de souris BALB/c chez qui le phénotype de bronchoconstriction suite à la sensibilisation et au challenge est plus important.

A. La sensibilisation à l'allergène

Les solutions sont préparées extemporanément comme suit :

- ✓ La solution de sensibilisation contient 0,5 mg/ml d'ovalbumine (ovalbumine, OVA, grade V- Sigma), 20 mg/ml d'hydroxyde d'aluminium (Aldrich), qui sert d'adjuvant, dans une solution saline stérile (NaCl 0,9%)
- ✓ La solution contrôle contient uniquement l' d'hydroxyde d'aluminium dans le NaCl.

Les solutions sont placées sous agitation à 4°C pendant 4h, puis ramenées à température ambiante avant utilisation.

Au jour 0 et 7 du protocole, les souris reçoivent 100µl de la solution contrôle ou de sensibilisation par injection intra péritonéale.

B. Le challenge à l'allergène

La solution utilisée pour le challenge à l'allergène est préparée avec 0,4 mg/ml d'ovalbumine dans du NaCl 0,9% stérile. Elle est immédiatement aliquotée et peut être conservée une semaine à -20°C.

L'anesthésique est préparé dans du NaCl 0,9% stérile pour injecter 50 mg/kg de kétamine et 3,3 mg/kg de xylazine par souris.

Les souris sont anesthésiées par 100µl de la solution kétamine/xylazine en injection intra péritonéale. Une fois endormie, la souris reçoit 25µl de la solution d'ovalbumine par instillation intra nasale. Les souris sensibilisées avec la solution contrôle sont instillées avec 25µl de NaCl 0,9%. Il peut arriver que la souris présente un arrêt respiratoire qui sera annulé par un léger massage de la cage thoracique. Les animaux sont ainsi surveillés jusqu'à leur réveil.

Au jour 17, 16h avant le premier challenge, les souris reçoivent une dose de 2mg d'anticorps antiS100B par injection intra péritonéale.

Le challenge ovalbumine est réalisé aux jours 18, 19 et 20 du protocole. La mesure de la réactivité bronchique, par pléthysmographie non invasive, est réalisée au jour 21, entre 18 et 24h après le dernier challenge. La collecte des échantillons (sérum, BALFs et poumons) est réalisée après la pléthysmographie. Ces étapes sont réalisées de la même manière que décrite pour le modèle LPS.

IX. Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats obtenus a été réalisée avec le logiciel Statgraphics (Centurion XV, sigma plus, Levallois Perret).

Pour les analyses statistiques, il est très important de considérer la nature des données (observations) que l'on teste, puisqu'elle définit le type de tests utilisables dans chaque situation. Les observations peuvent être soit quantitatives soit qualitatives.

Les données quantitatives comprennent les dénombrements et les mesures. La caractéristique étudiée dans le cas de dénombrements est une variable discontinue, qui ne peut prendre que des valeurs entières non négatives. Dans le cas des mesures, la variable est de nature continue et peut prendre des valeurs dont le nombre est illimité. La statistique la plus appropriée pour décrire la tendance centrale des données est la moyenne (caractérisée par le test de Student).

Les données qualitatives peuvent être assimilées au cas des variables discontinues. Elles peuvent être réalisées dans deux échelles de mesure : l'échelle ordinale et l'échelle nominale. Ces données ne sont pas manipulables par l'arithmétique. Dans l'échelle ordinale (de rangement), il existe une relation entre les observations du type plus grand que, supérieur à, plus difficile que, préférée à.... La statistique la plus appropriée pour décrire la tendance centrale des données est la médiane (caractérisée par le test de Mann-Whitney). Dans l'échelle nominale, le nombre attribué à chaque groupe le caractérise comme tel. Les seules statistiques descriptives utilisables dans ce cas sont le mode et la fréquence caractérisés par le test du Khi deux (χ^2).

Pour choisir le test statistique le plus approprié, l'un des critères de choix est la puissance du test utilisé. Le test de Student (t) est un des tests statistiques les plus puissants. Mais avant d'accepter les conclusions d'un tel test, il faut vérifier que ses conditions d'utilisations sont remplies. Ces conditions sont les suivantes :

- ✓ Les données doivent être indépendantes.
- ✓ Les observations doivent être réalisées sur des populations normales (courbe de Gauss) : les données d'asymétrie et d'aplatissement standard doivent être comprises entre + 2 et - 2.
- ✓ Ces populations doivent avoir la même variance. La validité de cette hypothèse peut être contrôlée à l'aide des tests d'égalité de variance (test de Fischer). Ainsi, si le test de Fisher conduit à rejeter l'égalité des variances ($p < 0.05$), le test de Student n'est plus valable.
- ✓ Les variables doivent être mesurées dans une échelle de mesure permettant l'utilisation des opérations arithmétiques.

Quand de telles hypothèses ne sont pas remplies, il est difficile de dire quel est le pouvoir réel du test et d'estimer la significativité de son résultat. Si, par contre, ces hypothèses sont confirmées et que la probabilité associée au test t est inférieure à 0,05, il est possible de rejeter l'hypothèse d'égalité des moyennes et donc de déclarer que les moyennes des deux populations sont significativement différentes au niveau de signification de 5%.

Dans le cas où l'on ne peut pas faire l'hypothèse de normalité sur les distributions des observations des deux échantillons, on doit utiliser un test non paramétrique. L'emploi de test non paramétrique se justifie lorsque les conditions d'applications des autres méthodes ne sont pas satisfaites. Le test de Mann-Whitney constitue une alternative non paramétrique au test t de Student. Le test de Mann-Whitney (U), est mis en œuvre pour comparer les médianes plutôt que les moyennes et sont ainsi moins sensibles à la présence de points extrêmes.

Pour des échantillons de taille très faible jusqu'à $n < 5$ ainsi que pour des données qualitatives, seuls des tests non paramétriques peuvent être utilisés.

Les analyses comparatives effectuées sur les paramètres de la réponse inflammatoire (concentrations des cytokines, de l'activité MPO, Q-PCR...) sont réalisées avec le test t de Student car elles suivent une distribution normale. Le seuil de significativité est fixé à 0.05.

Les données de pléthysmographie seront analysées par le test ANOVA. Le seuil de significativité est fixé à 0.05.

Résultats

I. Etude de l'implication du gène *Prmt2* dans la réponse inflammatoire au LPS

L'analyse préliminaire de la lignée Ms1Yah, portant la délétion de la région *Prmt2-Col6a1*, a montré que ces souris développent une inflammation accrue en réponse au LPS, alors que la détresse respiratoire observée est moins importante que chez les contrôles sauvages (Besson *et al.* 2007). L'analyse par Q-PCR, de l'expression des gènes de la région avait révélé cinq gènes *S100b*, *Dip2*, *Pcnt2*, *Q9D5N2* et *Q9D0B9*, comme étant dose sensible dans des poumons traités et non traités, alors que l'expression des gènes *Prmt2*, *Mcm3ap*, *Col6a2* et *C21orf57*, semble influencée par le LPS. Des six gènes de la région exprimés dans les macrophages, quatre sont sensibles au nombre de copies, mais leur expression n'était soit pas modifiée (*Prmt2*, *Pcnt2*, *Mcm3ap*) soit réduite (*Lss*) après traitement de LPS (Besson *et al.* 2007). Toutefois, il est important de préciser que ces analyses d'expression ont été menées après seulement trois backcross sur B6 (fond mixte B6.129N3).

A. Etude de la réponse inflammatoire des lignées Ms1Yah, *Prmt2*^{+/-} et B6

Le gène *Prmt2* code une protéine dont un des rôles est d'inhiber la voie NF-κB (Ganesh *et al.* 2006). Cette fonction de *Prmt2* laisse supposer que l'augmentation de la concentration en cytokines pro-inflammatoires observée chez les souris Ms1Yah, après stimulation par le LPS peut être due à une réduction de l'inhibition de la signalisation NF-κB causée par une diminution du nombre de dose fonctionnelle de *Prmt2*. Dans le but de tester cette hypothèse, nous avons comparé la réponse inflammatoire et l'hyper-réponse des voies aériennes (HRA) induite par le LPS, chez les individus des lignées Ms1Yah (1 copie des gènes de la région *Prmt2-Col6a1*), *Prmt2*^{+/-} (une copie du gène candidat *Prmt2*) et B6 (contrôles 2n).

Par ailleurs, la stimulation LPS des voies aériennes d'une souris sauvage induit une cascade d'évènements dont les plus caractéristiques sont : 1) l'élévation du temps de pause respiratoire (PenH>2,5). 2) un recrutement des neutrophiles dans les alvéoles pulmonaires, 3) la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α et l'IL-6. Ces cytokines sont stimulées directement par la voie LPS-TLR4 qui conduit à l'activation de NF-κB. Nous avons donc utilisé ces paramètres pour suivre la réponse pulmonaire et inflammatoire dans différentes conditions génétiques pour vérifier notre 1^{ère} hypothèse : la diminution du nombre

de dose fonctionnelle de *Prmt2* est responsable de la surproduction des cytokines pro-inflammatoires dans le modèle Ms1Yah, puisque cela induit en partie une levée de l'inhibition de la voie NF- κ B.

1. Analyse de la réponse inflammatoire dans les BALFs

L'équipe a montré que le LPS induit une augmentation du nombre de neutrophiles, ainsi qu'une augmentation de la production d'IL-6 et TNF- α dans l'espace bronchoalvéolaire des souris Ms1Yah. Nous avons ensuite supposé que le même phénomène pouvait être retrouvé chez les souris *Prmt2*^{+/-}. Pour démontrer l'implication de *Prmt2* dans ce phénotype, 10 souris *Prmt2*^{+/-} et contrôles ont été exposées à une instillation de LPS ou d'une solution saline contrôle (NaCl). Afin de restreindre le nombre d'animaux utilisés, ces souris ont également été utilisées pour mesurer l'HRA induite par le LPS, dont le résultat est décrit dans le paragraphe suivant. Les souris ont été sacrifiées 24h après l'instillation de LPS. L'inflammation pulmonaire a été vérifiée par trois paramètres :

- La mesure de la production des cytokines IL-6 et TNF- α dans les BALFs
- Le recrutement des neutrophiles
- La mesure de l'activité myéloperoxydase reflétant l'activation des neutrophiles.

Dans un premier temps, les concentrations en IL-6 et TNF- α présentes dans les lavages bronchoalvéolaire ont été mesurées par ELISA. Il s'avère que l'application locale du LPS entraîne une production significativement accrue, à la fois de TNF- α et d'IL-6 chez les souris *Prmt2*^{+/-} en comparaison des souris euploïdes (*Figure 19*). Ce résultat renforce l'hypothèse de l'implication de *Prmt2* dans la dérégulation de l'inflammation.

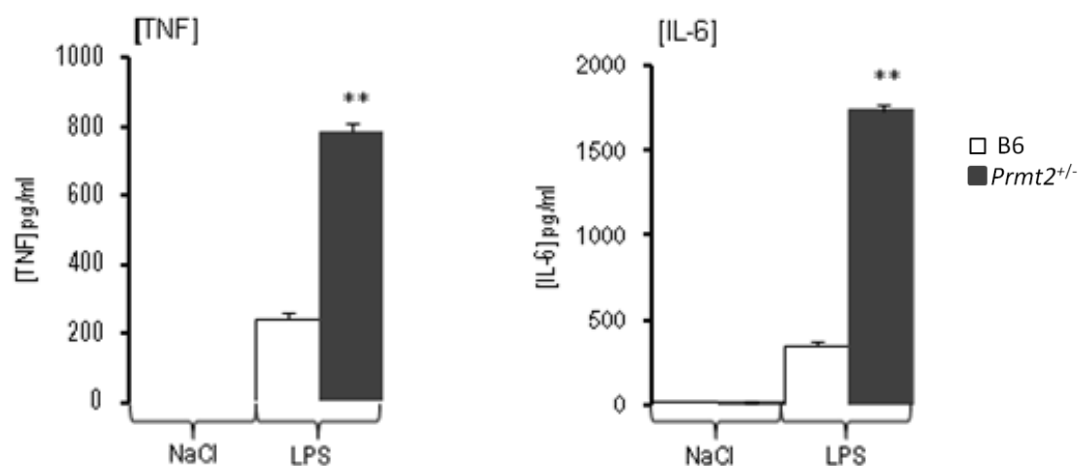


Figure 19: Caractérisation de la réponse inflammatoire induite par le LPS, dans les BALFs des souris B6 (en blanc) et $Prmt2^{+/-}$ (en noir) ($n=10$ par groupe). La concentration des deux cytokines est augmentée chez les $Prmt2^{+/-}$ par rapport aux B6, après stimulation LPS. Test de Student : ** $P \leq 0.01$.

Nous avons ensuite analysé l'impact du LPS sur le recrutement cellulaire dans les poumons des souris des différents génotypes. Les souris $Prmt2^{+/-}$ instillées avec la solution saline ne montrent aucune modification dans la composition cellulaire pulmonaire comparée aux souris B6. Dans ce cas, la grande majorité des cellules présentes dans l'espace broncho pulmonaire est constituée par les macrophages résidents.

Comme décrit pour la lignée Ms1Yah, les souris de la lignée $Prmt2^{+/-}$ présentent une augmentation du nombre de neutrophiles recrutés dans les poumons, après instillation de LPS (Figure 20). Ce résultat est en accord avec l'augmentation de la concentration des cytokines dans les BALFs, puisque le $TNF-\alpha$ participe au recrutement des neutrophiles.

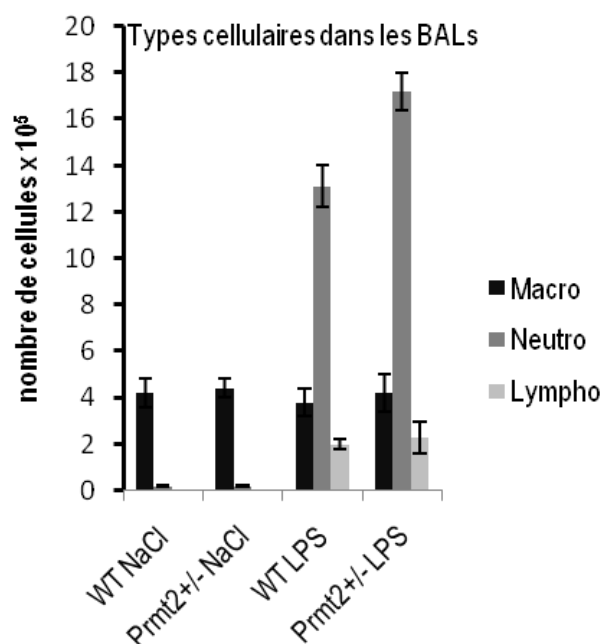


Figure 20: caractérisation des différents types cellulaires présents dans les BALFs (NaCl n=5, LPS n=10 par lignée). Le LPS induit une augmentation significative du nombre de neutrophiles recrutés chez les souris *Prmt2*^{+/-}.

Le dernier paramètre analysé qui reflète l'intensité de l'inflammation est l'activité de la myéloperoxydase (MPO). Cette enzyme est spécifique de l'activité des neutrophiles. L'activité MPO est mesurée à partir de broyat de poumon des souris stimulées au NaCl ou au LPS.

L'application locale de NaCl n'induit aucune modification de l'activité MPO entre les souris contrôles et *Prmt2*^{+/-}. La stimulation par le LPS entraîne une augmentation de l'activité MPO qui est plus importante chez la lignée *Prmt2*^{+/-} que chez les sauvages (Figure 21). Ce résultat est en accord avec l'augmentation du nombre de neutrophiles recrutés dans les BALFs, chez la lignée *Prmt2*^{+/-}.

L'ensemble de ces premiers résultats montre que le gène *Prmt2* intervient dans la régulation de la réponse inflammatoire au niveau local, dans les poumons.

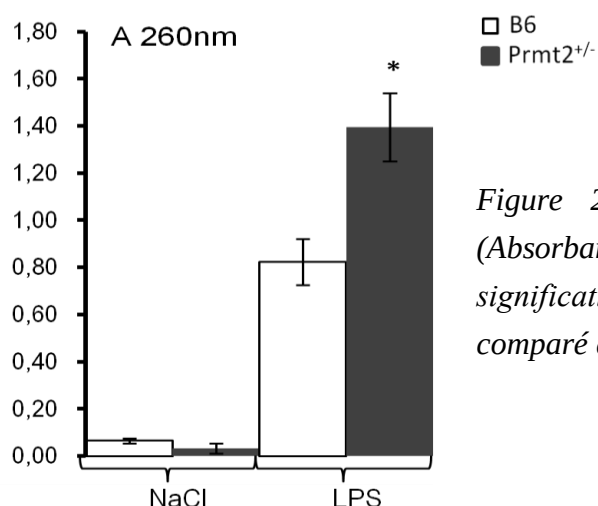


Figure 21: mesure de l'activité myéloperoxydase (Absorbance : 460 nm). Le LPS induit une augmentation significative de l'activité MPO chez les souris *Prmt2*^{+/-} comparé aux sauvages.

2. Mesure de la réponse sérique

Nous avons ensuite voulu étendre cette observation et voir si le choc systémique induit par le LPS conduit au même type d'hyper-réponse inflammatoire systémique, chez les souris Ms1Yah et *Prmt2*^{+/-}. Nous avons injecté en intra-péritonéale (i.p.) 100µg de LPS (ou solution saline contrôle) chez 10 souris de chaque lignée, en plus des contrôles B6. Dans le but de restreindre le nombre d'animaux utilisés, les poumons de ces souris ont été prélevés et stockés en vue de l'analyse de l'expression des gènes *IL-6*, *TNF-α* et *Prmt2* par Q-PCR.

L'inflammation induite par le LPS active la signalisation NF-κB, via le TLR4 et MYD88. La réponse inflammatoire a été analysée par la mesure de la concentration de deux des cytokines dont la production est dépendante de l'activation de la voie NF-κB : *IL-6* et *TNF-α*. Les souris ont été sacrifiées 90min après l'injection de LPS (ou NaCl), temps nécessaire pour observer une réponse inflammatoire significative. Les cytokines ont été mesurées par ELISA.

Comme attendu, la concentration en *IL-6* augmente à la fois chez les souris Ms1Yah et *Prmt2*^{+/-}, par rapport aux souris 2n, après stimulation par le LPS (Figure 22). La réponse du *TNF-α* est différente. En effet, comme montré par Besson *et al.* (2006), les souris monosomiques présentent une concentration en *TNF-α* significativement plus élevée que les contrôles. Cependant, la concentration en *TNF-α* chez les souris *Prmt2*^{+/-} et B6 est sensiblement identique, même si elle augmente par rapport aux souris ayant reçu le NaCl

(Figure 22). Ces résultats préliminaires montrent que les lignées *Prmt2*^{+/-} et Ms1Yah développent la même dérégulation dans la réponse à l'IL-6 systémique.

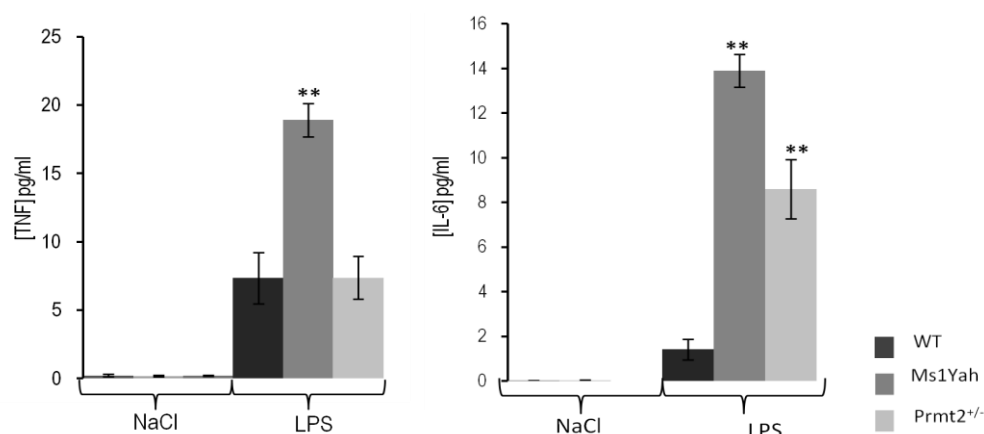


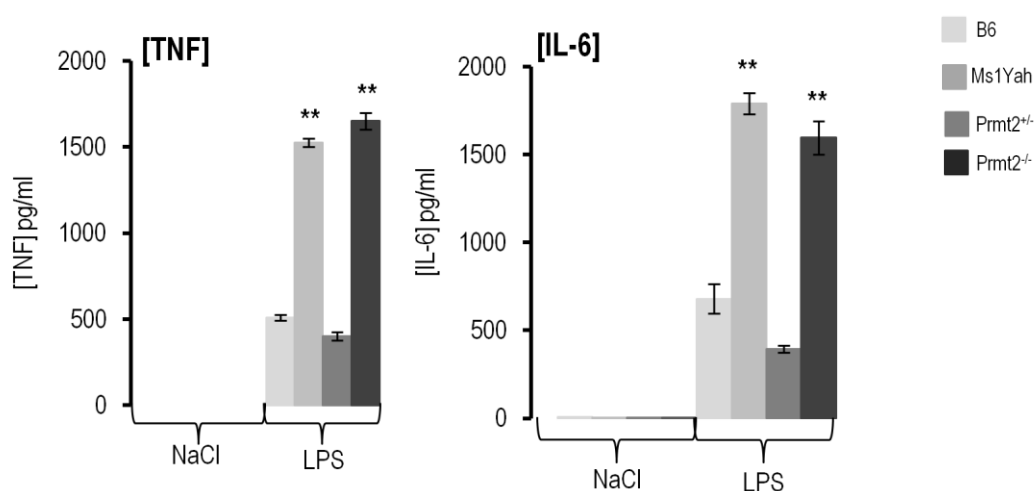
Figure 22 : caractérisation de la réponse inflammatoire induite par le LPS, dans le sérum des souris Ms1Yah, *Prmt2*^{+/-} et B6 (n=10 par groupe). La concentration en TNF- α est augmentée chez les Ms1Yah. La concentration en IL-6 croît significativement chez les Ms1Yah et *Prmt2*^{+/-}, par rapport aux B6, après stimulation LPS. Test de Student : * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$.

3. Mesure de la concentration en cytokines produites par les macrophages

La source principale de TNF- α produit en réponse au LPS provient des macrophages activés. Afin de déterminer le rôle des macrophages dans l'augmentation de la concentration en cytokines, ces dernières ont été mesurées dans le surnageant de macrophages dérivés de la moelle osseuse à partir des lignées B6, Ms1yah et *Prmt2*^{+/-}, 24h après la stimulation LPS ou NaCl. Là aussi, l'ARN provenant des cellules a été conservé afin d'analyser l'expression des gènes *Prmt2*, *IL-6* et *TNF- α* par Q-PCR.

L'ajout de NaCl dans le milieu de culture n'entraîne aucune modification dans la concentration des cytokines, quelle que soit la lignée considérée. Comme déjà observé, les concentrations des deux cytokines IL-6 et TNF- α augmentent dans les surnageants de la lignée Ms1Yah (Figure 23). Cependant, de façon inattendue, ces mêmes concentrations diminuent dans les surnageants de macrophages issus de la lignée *Prmt2*^{+/-}. Afin de vérifier s'il ne s'agit pas d'une erreur, la même expérience a été réalisée sur des

macrophages de souris *Prmt2*^{-/-}. Dans ce cas, les souris ne synthétisent plus la protéine Prmt2, on s'attend donc à une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires puisque la voie NF-κB ne sera plus inhibée. Effectivement, les macrophages issus des souris *Prmt2*^{-/-} produisent significativement plus de TNF-α et d'IL-6 après stimulation LPS (*Figure 23*).



*Figure 23: Caractérisation de la réponse inflammatoire induite par le LPS, dans le surnageant des macrophages des souris B6, Ms1Yah, *Prmt2*^{+/-} et *Prmt2*^{-/-} (n=5 par groupe). La concentration des deux cytokines est augmentée chez les Ms1Yah et *Prmt2*^{-/-} par rapport aux B6, après stimulation LPS. Test de Student : ** $P \leq 0.01$.*

L'ensemble de ces résultats suggère que chez les souris Ms1Yah la diminution du nombre de dose du gène *Prmt2* entraîne une augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF-α, ce qui expliquerait l'élévation du nombre de neutrophiles recrutés en réponse au LPS. Au vu des niveaux produits par les macrophages Ms1Yah ou porteurs de la mutation homozygote de *Prmt2*, il semble qu'au moins un autre gène interviendrait dans la lignée Ms1Yah pour expliquer l'augmentation de la synthèse des cytokines par les macrophages. Cet autre gène devrait agir en amont de *Prmt2*, sur la voie d'activation du TNF-α.

B. Etude de l'expression des gènes *Prmt2*, *IL-6* et *TNF-α* par Q-PCR

Les résultats précédents suggèrent une régulation de l'expression des gènes *IL-6* et *TNF-α* par *Prmt2*. Afin de tester cette hypothèse, nous avons étudié l'expression des gènes *Prmt2*, *IL-6* et *TNF-α*, à partir d'ARN totaux provenant des poumons des souris ayant reçu le LPS ou la solution saline contrôle par injection en i.p. (lignées Ms1Yah, *Prmt2*^{+/-} et B6). Afin de déterminer le rôle des macrophages dans la sécrétion des cytokines, ces mêmes mesures ont été réalisées à partir d'ARN totaux de macrophages des lignées B6, Ms1yah et *Prmt2*^{+/-}, stimulés ou non au LPS.

1. Analyse *in vivo* : à partir des poumons

Les poumons des souris stimulées ont été prélevés 90min après l'injection de LPS, et l'expression des gènes *IL-6*, *TNF-α* et *Prmt2* a été analysée par Q-PCR.

Les niveaux d'expression ont été évalués à partir des ARNm totaux dont la quantité a été mesurée par Nanodrop et la qualité par Bioanalyseur (voir Matériels et Méthodes). Les résultats ont été normalisés grâce au logiciel Genorm. Pour toutes les expériences de Q-PCR, en plus des gènes d'intérêt, j'ai mesuré l'expression des gènes de ménage suivants : *18S*, *GAPDH*, *ActB*, *β2m*, *Pgk1*, *Rpl13a*, *Tbp* et *Tub4*. L'utilisation de Genorm permet d'identifier les deux meilleurs gènes de ménage pour lesquels l'expression varie le moins dans tous les échantillons. Ces gènes peuvent être organes dépendants en fonction des conditions, mais ici il s'agit de *GAPDH* et *β2m* pour les poumons et les macrophages. Ensuite Genorm calcule un facteur de normalisation qui va servir à calculer l'expression relative des gènes d'intérêt par rapport aux gènes de ménage. La condition pour laquelle l'expression relative est rapportée à 1 est une souris B6 contrôle après stimulation par le LPS. J'ai choisi cette condition car la stimulation par le NaCl n'entraîne aucune modification de l'expression des gènes d'intérêt, qui ne sont normalement exprimés qu'en situation d'inflammation.

Le NaCl n'entraîne pas de modification dans l'expression des gènes *IL-6* et *TNF-α*. Le gène *Prmt2* est quant à lui exprimé fortement en absence de LPS. Cela peut s'expliquer par le fait qu'en absence de stimulus, la voie de signalisation NF-κB doit être « éteinte », ce qui nécessite entre autre la présence de *Prmt2*.

Le LPS induit une augmentation de l'expression d'*IL-6* à la fois dans les poumons des souris *Prmt2*^{+/-} et Ms1Yah par rapport aux contrôles B6. L'expression de *TNF-α* est sensiblement augmentée dans les poumons des souris *Prmt2*^{+/-} et Ms1Yah, néanmoins cette augmentation est moins importante dans la lignée *Prmt2*^{+/-} par rapport aux souris Ms1Yah (Figure 25).

La diminution de l'expression de *Prmt2* chez les souris Ms1Yah et *Prmt2*^{+/-} confirme qu'il s'agit d'un gène dose-sensible dans les poumons. On observe une diminution de l'expression de *Prmt2* dans les poumons des souris *Prmt2*^{+/-} et Ms1Yah, alors que l'expression des cytokines *IL-6* et *TNF-α* augmente (Figure 25). Dans les poumons, il y a bien une corrélation entre le nombre de dose de *Prmt2* et l'expression des gènes *IL-6* et *TNF*. L'ensemble de ces résultats montre que *Prmt2* agit sur l'expression de *IL-6* et *TNF-α*, de façon dose dépendante. Cependant, l'expression du *TNF-α* semble être contrôlée par un autre élément dont la fonction est perturbée dans les mutants Ms1Yah.

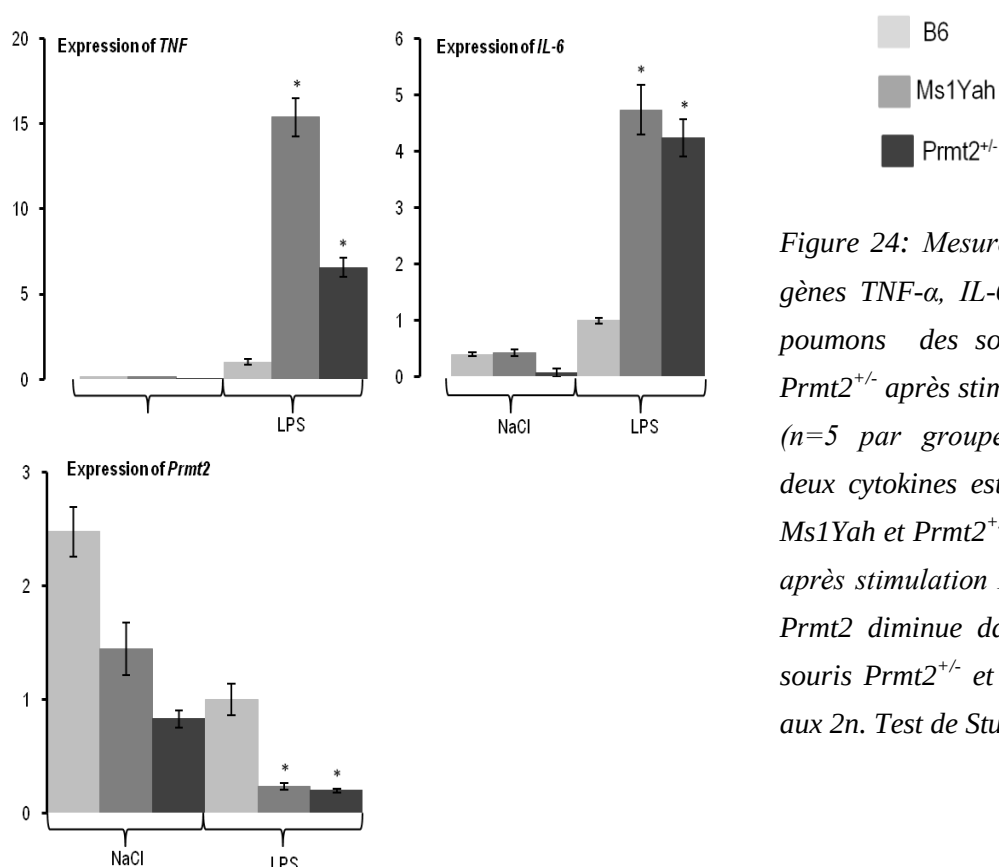


Figure 24: Mesure de l'expression des gènes *TNF-α*, *IL-6* et *Prmt2*, dans les poumons des souris B6, Ms1Yah et *Prmt2*^{+/-} après stimulation LPS ou NaCl (*n*=5 par groupe). L'expression des deux cytokines est augmentée chez les Ms1Yah et *Prmt2*^{+/-} par rapport aux B6, après stimulation LPS. L'expression de *Prmt2* diminue dans les poumons des souris *Prmt2*^{+/-} et Ms1Yah par rapport aux 2n. Test de Student : **P*≤0.05.

2. Analyse *in vitro* : à partir des macrophages

Les macrophages ont été lysés 24h après la stimulation par le LPS ou par la solution de NaCl.

Le NaCl n'entraîne pas d'expression des gènes *IL-6* et *TNF-α* par les macrophages. De la même façon que dans les poumons, le gène *Prmt2* est quant à lui exprimé d'un facteur 0,5 dans les macrophages des souris B6 et Ms1Yah et d'un facteur 2,5 dans les macrophages des souris *Prmt2*^{+/-}.

Le LPS entraîne une augmentation significative de l'expression des gènes *IL-6*, *TNF-α* chez les souris Ms1Yah, ce qui est cohérent avec l'augmentation de la concentration des cytokines dans le surnageant des macrophages. Les souris Ms1Yah ne possédant qu'une copie fonctionnelle de *Prmt2*, ce gène est moins exprimé par les macrophages des souris Ms1Yah par rapport à ceux des souris B6, mais pas de manière significative (*Figure 24 P=0,056*). Chez les Ms1Yah, l'augmentation de l'expression d'*IL-6*, *TNF-α* est donc corrélée avec une diminution du nombre de copie de *Prmt2* dans les macrophages.

Les macrophages dérivés des souris *Prmt2*^{+/-} expriment significativement plus d'*IL-6* et de *TNF-α*, cependant de façon inattendue, le gène *Prmt2* est lui aussi surexprimé par rapport aux macrophages des souris 2n (*Figure 24*).

Dans les macrophages des souris Ms1Yah, on retrouve une corrélation entre le nombre de dose de *Prmt2* et l'expression des gènes *IL-6* et *TNF*.

Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle une seule copie du gène *Prmt2* suffirait *in vitro* à réguler la voie NF-κB mais que au moins un autre gène interviendrait chez la lignée Ms1Yah pour expliquer l'augmentation de la synthèse des cytokines par les macrophages.

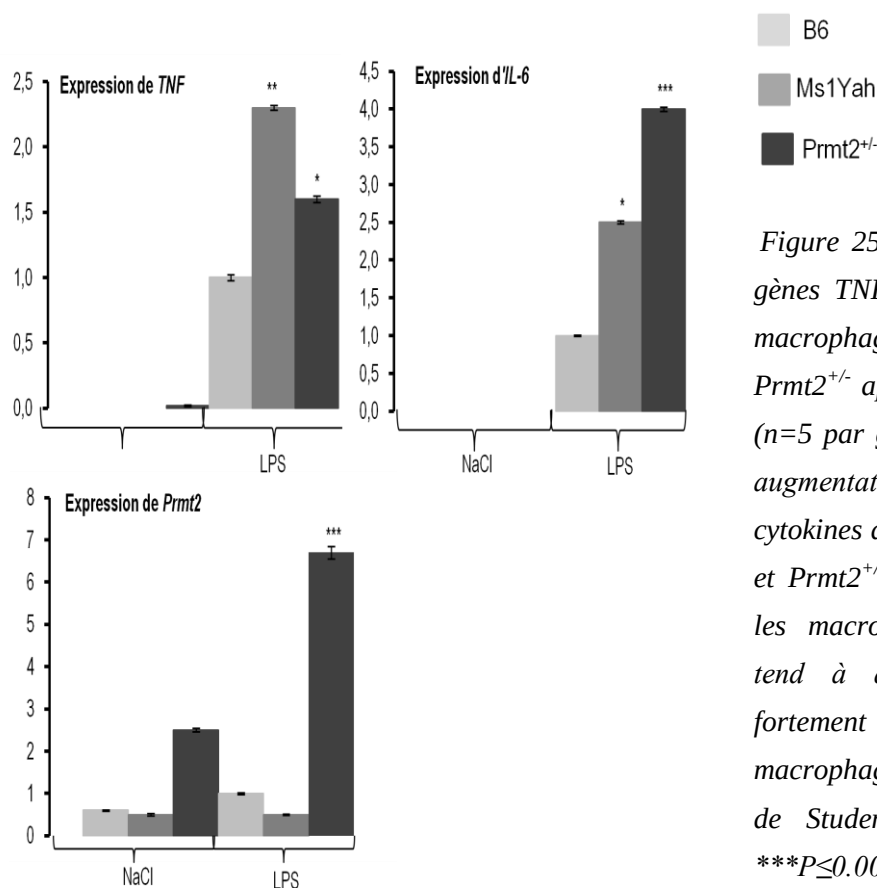


Figure 25: Mesure de l'expression des gènes *TNF-α*, *IL-6* et *Prmt2*, dans des macrophages des souris B6, Ms1Yah et *Prmt2*^{+/-} après stimulation LPS ou NaCl (n=5 par groupe). Le LPS entraîne une augmentation de l'expression des deux cytokines dans les macrophages Ms1Yah et *Prmt2*^{+/-}. L'expression de *Prmt2* dans les macrophages des souris Ms1Yah tend à diminuer alors qu'elle est fortement augmentée dans les macrophages des souris *Prmt2*^{+/-}. Test de Student : * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$ et *** $P \leq 0.001$

C. Evaluation de la fonction respiratoire des souris *Prmt2*^{+/-}

Nous avons ensuite voulu savoir si la fonction respiratoire des souris *Prmt2*^{+/-} était aussi peu modifiée par le LPS que celle des souris Ms1Yah.

Pour cela, les souris *Prmt2*^{+/-} instillées avec le LPS (n=10) ou avec le NaCl (n=5), ainsi que les contrôles B6, ont été placées dans les chambres d'un pléthysmomètre. En effet, la stimulation des voies aériennes par une exposition intranasale au LPS entraîne une réponse complexe comprenant l'inflammation et la contraction des bronches et des bronchioles. L'hyper-réponse des voies aériennes (HRA) a été suivie grâce au paramètre appelé temps de pause respiratoire (PenH).

L'instillation de la solution saline contrôle (NaCl) ne modifie en rien la respiration, alors que le LPS entraîne une contraction des muscles lisses. Cette manifestation est caractérisée par une augmentation du PenH, avec un maximum de 3,19 à 95min après la stimulation chez les souris contrôles. Après avoir atteint la valeur maximum, le PenH décroît jusqu'à revenir au niveau basal à la fin de l'expérience. Étonnamment, et contrairement à ce

qu'on observe chez les souris Ms1Yah, les souris *Prmt2*^{+/-} présentent une HRA qui débute un peu plus tard que chez les B6, et surtout la valeur maximum du PenH est bien plus élevée (4,5 à 175min). De plus, la valeur du PenH décroît plus lentement et il n'y a pas de retour à la normale, même après 6h d'acquisition (Figure 26).

L'augmentation de la HRA observée chez les souris *Prmt2*^{+/-}, suggère d'une part que l'absence d'une copie de *Prmt2* suffit pour que la fonction pulmonaire soit altérée, et d'autre part que la réponse au LPS des voies aériennes des souris Ms1Yah est régulée par un ou plusieurs autre(s) gène(s) puisque ces souris ne présentent pas de HRA.

De façon intéressante, les résultats de cette première partie confirment d'une part l'implication de *Prmt2* dans la régulation de l'expression des gènes dont la transcription est NF- κ B dépendante. *Prmt2* est donc bien un inhibiteur de la réponse inflammatoire, via son rôle dans la voie NF- κ B. D'autre part, il semble qu'au moins un autre gène de la région *Prmt2-Col6a1* intervienne pour expliquer l'absence de HRA observée chez la lignée Ms1Yah.

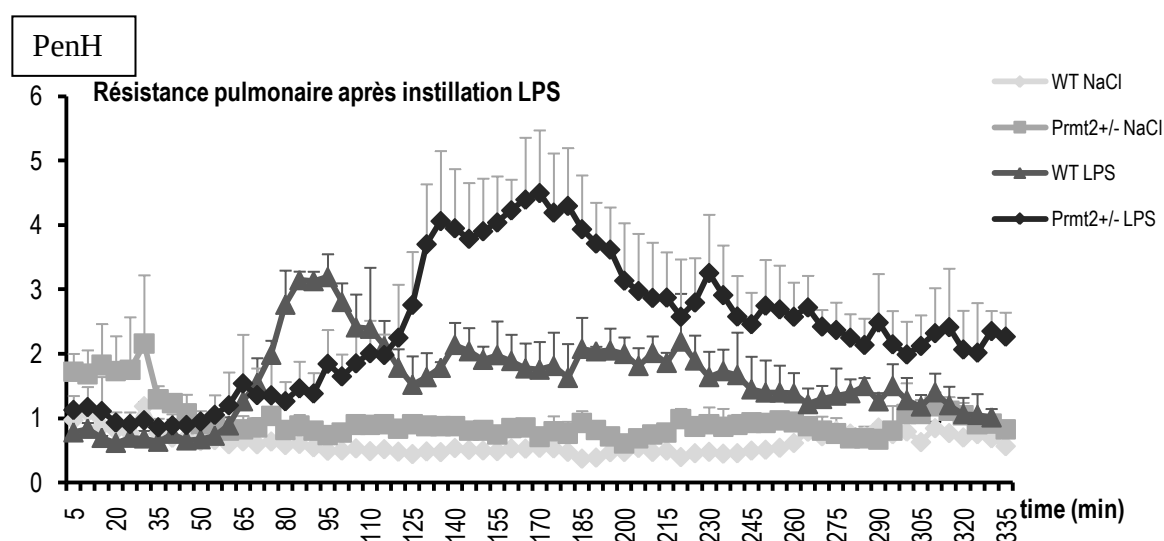


Figure 26: Mesure de la résistance des voies respiratoires des souris B6 et *Prmt2*^{+/-} instillées au LPS (n=10) ou NaCl (n=5). Le LPS augmente sensiblement la valeur du PenH des souris *Prmt2*^{+/-} (Anova, $P < 0,05$).

II. Recherche par Q-PCR, de nouveaux gènes candidats pour les phénotypes observés

L'analyse de l'expression par Q-PCR réalisée avant mon arrivée au laboratoire avait mis en évidence plusieurs gènes dont l'expression était modifiée par le LPS chez la lignée Ms1Yah. Toutefois, il est important de préciser que ces analyses d'expression ont été menées sur un fond mixte B6.129N3 avec 3 niveaux de croisement en retour (backcross N3). J'ai donc vérifié l'expression des gènes candidats, sur des backcross plus élevés (backcross >7). L'étude a été menée *in vitro*, à partir des ARN totaux issus des macrophages, ainsi qu'*in vivo* avec les ARN issus des poumons des souris B6 et Ms1Yah. L'expression a été analysée par Q-PCR pour les gènes suivants : *S100B*, *Pcnt2*, *Lss* et *Mcm3ap*.

Toujours dans le but de restreindre le nombre de souris utilisées, ces expériences ont été menées à partir des ARN déjà obtenus lors les analyses précédentes.

A. Etude *in vitro*, à partir des macrophages

Nous avons retrouvé l'expression dose dépendante du gène *Pcnt2* qui est down-régulée par le LPS. Ici, l'expression de *Mcm3ap* augmente chez les souris Ms1Yah alors qu'elle avait été montrée comme diminuant de façon dose dépendante. Par ailleurs, *Lss* n'avait pas été montré comme étant exprimé dans les macrophages alors qu'ici *Lss* est exprimé plus fortement chez les Ms1Yah NaCl et l'expression diminue suite à la stimulation LPS.

Notons que l'absence d'expression de *S100B* dans les macrophages est confirmée (*Figure 27*).

Les différences de résultats obtenus peuvent s'expliquer par le nombre de backcross. Plus le nombre de backcross augmente, moins les allèles du fond génétique 129 auront d'effets. Je pense que la confirmation des résultats pour *Pcnt2* et *S100B* tient au fait que leurs effets sont majeurs.

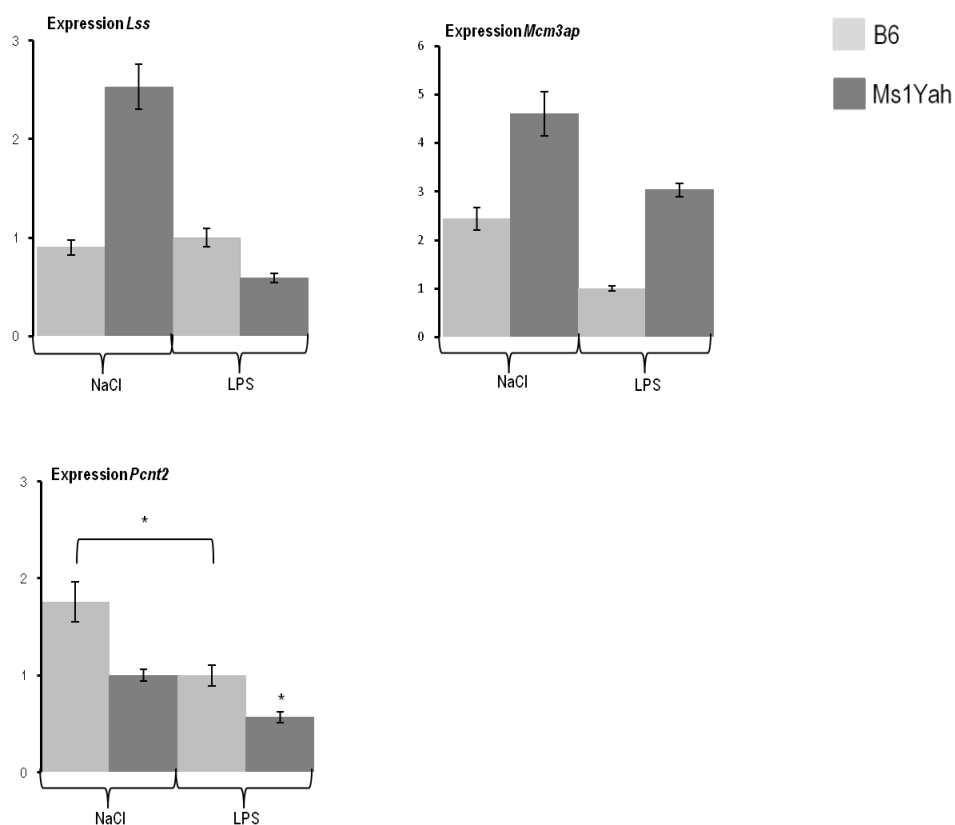


Figure 27: Analyse de l'expression des gènes *Lss*, *Mcm3ap*, *Pcnt2* et *S100B* dans les macrophages des souris B6 et Ms1Yah. Seule l'expression de *Pcnt2* reste dose dépendante et modifiée par le LPS, sur fond B6 pur. L'absence d'expression de *S100B* dans les macrophages est confirmée sur fond pur. Test de Student, * $P < 0,05$.

B. Etude *in vivo*, à partir des poumons

Dans les poumons, là aussi les résultats précédemment obtenus pour *Pcnt2* et *S100B* sont confirmés. Ces deux gènes ont une expression dose dépendante, qui diminue lorsque les souris ont été stimulées au LPS (Figure 28). Le résultat trouvé *in vitro* pour *Pcnt2* est confirmé *in vivo*. *S100B* est bien exprimé dans le poumon, mais par un autre type cellulaire que les macrophages.

Les analyses préliminaires avec 3 backcross ne montraient pas d'expression de *Lss* dans les poumons, ce qui était contradictoire avec le fait que ce gène était exprimé dans les macrophages. Dans cette étude, j'ai confirmé que *Lss* est exprimé dans les macrophages et montré son expression dans le compartiment pulmonaire. Toutefois, l'expression dose dépendante de *Mcm3ap* dans le poumon n'est pas retrouvée (Figure 28).

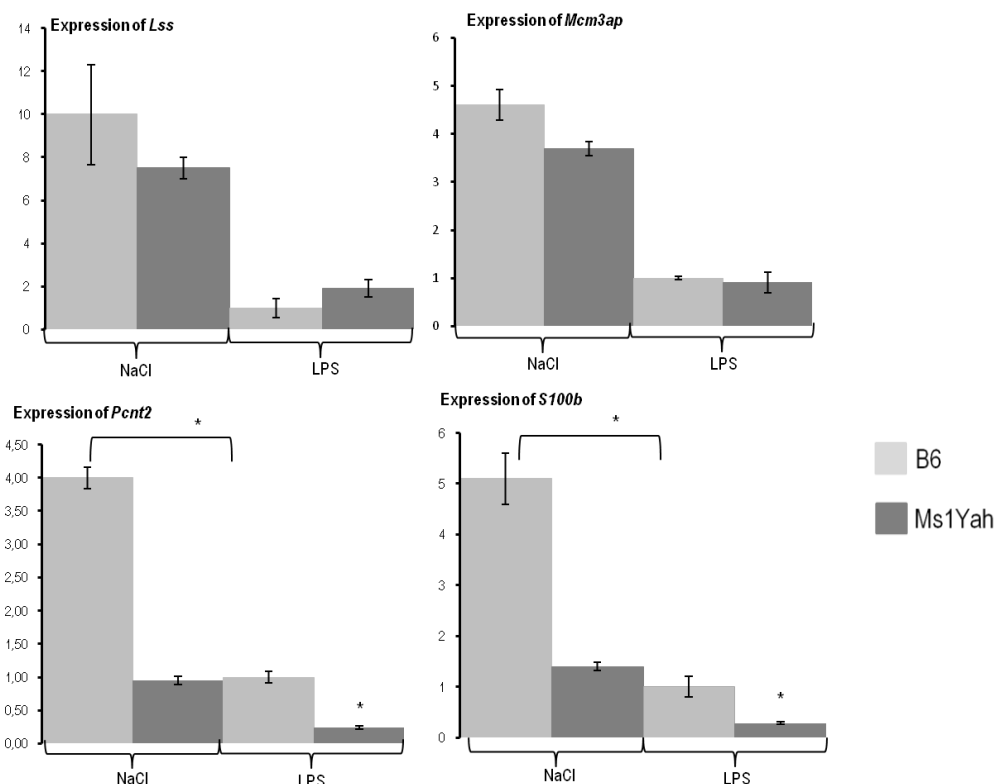


Figure 28: Analyse de l'expression des gènes *Lss*, *Mcm3ap*, *Pcmt2* et *S100B* dans les poumons des souris B6 et Ms1Yah. L'expression des gènes *Pcmt2* et *S100B* est bien dose dépendante et est modifiée par le LPS. Test de Student, * $P < 0,05$.

La recherche de gènes candidats à l'explication des phénotypes observés chez les souris Ms1Yah met en évidence deux candidats *Pcmt2* et *S100B*, dont les expressions sont dose dépendante dans les poumons et modifiées par le LPS. Nous avons exclu de nos analyses *Pcmt2* car des investigations indépendantes menées par d'autres collaborateurs de l'équipe nous ont suggéré que l'expression de ce gène est nécessaire dès les premières divisions cellulaires lors de l'embryogenèse, de manière à constituer de nouveaux pools de cette protéine et permettre d'assurer la séparation des chromosomes lors de la mitose. L'obtention d'un mutant conditionnel s'avère donc un pré-requis pour aborder la fonction de cette protéine dans notre système.

Le fait que les souris Ms1Yah et *Prmt2*^{+/-} montrent une réponse des voies aériennes différente, suggère que la différence est plus associée au fonctionnement des poumons, je me

suis donc intéressée au gène *S100B* dont l'expression est détectée dans les poumons mais pas dans les macrophages.

III. Evaluation du rôle de *S100B* dans les phénotypes d'inflammation et d'hyper-réponse des voies aériennes observés dans la lignée Ms1Yah

Morbini *et al.* (2006) ont montré d'une part que *S100B* est exprimé dans les poumons, au niveau des cellules dendritiques interstitielles et dans les nerfs péri-bronchiaux, et d'autre part que le nombre de cellules exprimant *S100B* augmente lorsqu'il y a inflammation du poumon. De plus, la protéine *S100B* stimule l'inflammation par l'activation de la voie NF- κ B via le récepteur RAGE (Shanmugam *et al.* 2003).

Au vu de ces données, il nous a paru intéressant d'évaluer le rôle de *S100B* dans les phénotypes observés chez les souris Ms1Yah. Les individus *S100B*^{+/-}, possèdent une seule copie du gène *S100B*, tout comme les souris de la lignée Ms1Yah. L'intérêt de générer des individus *S100B*^{-/-} est de vérifier s'il y a un effet dose dépendant sur le(s) phénotype(s) qui peu(ven)t être observé(s).

A. Etude de la cinétique de la concentration en *S100B*, au cours de l'inflammation induite par le LPS, chez la souris sauvage

Afin d'optimiser les conditions (temps de prélèvement notamment) dans lesquelles seront réalisées les expériences sur les souris *S100B*^{+/-} et *S100B*^{-/-}, et de voir comment se comporte la protéine *S100B* au cours de l'inflammation, nous avons réalisé une cinétique de dosage chez des souris B6.

L'inflammation locale a été mesurée par les trois paramètres déjà cités :

- Mesure par ELISA des concentrations en IL-6 et TNF- α dans les BALFs
- Recrutement des neutrophiles
- Mesure de l'activité MPO

Dans un second temps, afin de vérifier que le traitement par le LPS a bien eu lieu, nous avons vérifié la réponse inflammatoire systémique par le dosage des cytokines IL-6 et TNF- α dans le sérum.

1. Etude de la réponse inflammatoire dans les BALFs

Nous avons suivi le recrutement des différents types cellulaires présents dans les BALFs, lors de la stimulation intranasale par le LPS. En absence de stimulus, les macrophages résidents représentent la majorité des cellules présentes. Jusqu'à $t=2h$, les macrophages sont majoritaires, puis à partir de $t=4h$ on observe un shift entre les macrophages et les neutrophiles, ces derniers représentent alors la majorité des cellules dans les BALFs (*Figure 29 A*). Ce résultat est en accord avec les données d'Olson et Ley (2002) qui montrent que les neutrophiles sont majoritairement recrutés après la stimulation LPS.

Nous avons ensuite suivi la cinétique d'apparition du TNF- α et de l'IL-6. Comme le montre la figure 30, la concentration en TNF- α augmente de façon significative à partir de $t=2h$, alors que la production d'IL-6 débute juste après la stimulation (*Figure 29 B*). L'augmentation des concentrations en TNF- α et IL-6 à partir de $t=2h$ coïncide avec le fait qu'à ce même temps débute le recrutement des neutrophiles au site de l'inflammation. Ces concentrations augmentent encore au temps $t=4h$ et $6h$, ce qui est aussi en accord avec l'augmentation du nombre de neutrophiles et la diminution du nombre des macrophages dans les alvéoles pulmonaires.

Ces résultats sont en accord avec la littérature (Vanderbilt *et al.* 2003) et nous permettent de valider la cinétique de production de S100B qui apparaît dans les BALFs dès $t=30min$. Il faut noter que les diminutions de la concentration de S100B aux temps $t=4h$ et $6h$, par rapport à $t=2h$ ne sont pas significatives (*Figure 29 B*).

La concentration en S100B semble maximale à $t=2h$, mais ne diminue pas de façon significative à $t=6h$, ce qui permet d'utiliser les même souris pour enregistrer la réponse pulmonaire au pléthysmomètre et pour analyser la réponse inflammatoire ainsi que la concentration en S100B, après la période d'acquisition.

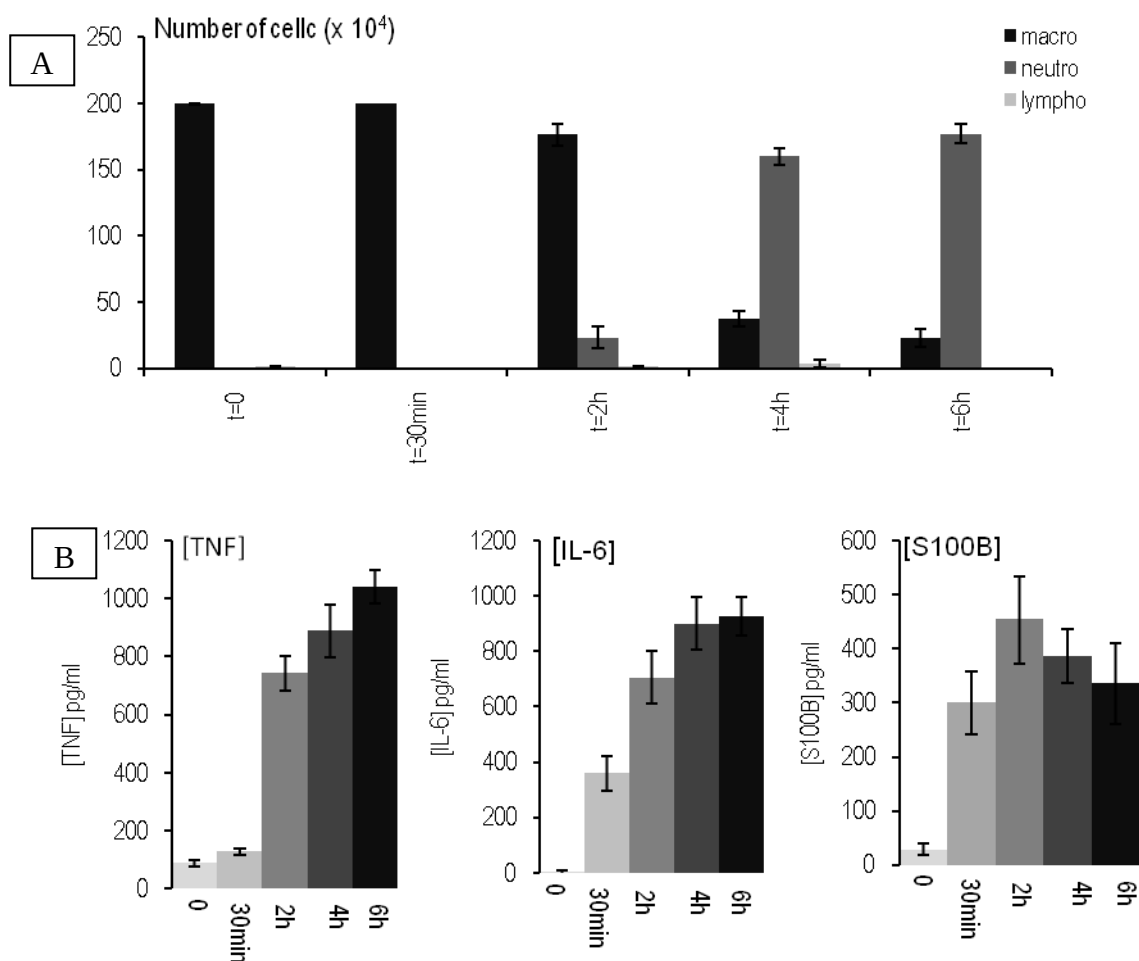


Figure 29 : Cinétique de la réponse inflammatoire induite par le LPS, dans les BALFs de souris B6 ($n=5$ par groupe) aux temps 0, 2h, 4h et 6h. A partir de $t=2h$ les neutrophiles sont recrutés et sont majoritaires dès 6h. la production de $TNF-\alpha$ augmente fortement à partir de 2h alors que la production d' $IL-6$ et $S100B$ est observable dès 30min.

2. Etude de la réponse inflammatoire systémique

Cette mesure permet de vérifier que la stimulation s'est bien déroulée, puisque l'on doit retrouver une augmentation de la concentration en cytokines pro-inflammatoires dans le sérum.

Les concentrations des deux cytokines $TNF-\alpha$ et $IL-6$ augmentent de façon importante à partir de $t=4h$ (Figure 30). La présence de $TNF-\alpha$, même au temps 0 s'explique par le fait que certaines cellules, en particulier les macrophages, possèdent un stock d'ARNm $TNF-\alpha$ prêt à être traduit dès les premiers signaux d'inflammation, ce qui permet une réponse rapide.

S100B apparaît dès 4h, et augmente fortement entre 4 et 6h. Ce profil est identique à celui de l'IL-6, bien que la concentration en S100B (48pg/ml à t=6h) soit inférieure à celles de l'IL-6 (135pg/ml à t=6h) et TNF- α (138pg/ml à t=6h) (*Figure 30*). Notons ici que la concentration de chacune de ces cytokines est environ 7,5 fois moins élevée dans le sérum que dans les BALFs. Le fait que la réponse soit plus rapide dans les BALFs que dans le sérum est normal, puisque les cytokines sont d'abord produites aux environs du site de l'inflammation avant de passer dans la circulation systémique.

La sécrétion de S100B dans les BALFs, puis sa présence dans le sérum après la stimulation des souris par le LPS renforcent l'idée selon laquelle S100B participerait à la réponse pulmonaire.

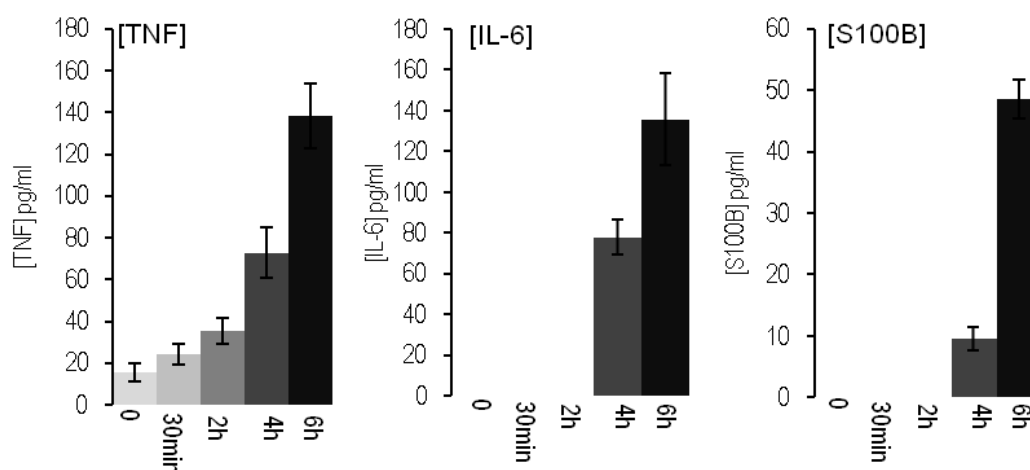


Figure 30: Concentration en TNF- α , IL-6 et S100B dans le sérum de souris B6 stimulées au LPS, aux temps 0, 30min, 2h, 4h et 6h. Les trois protéines sont fortement exprimées à partir de t=4h après la stimulation.

B. Etude de la perte de fonction de S100B sur la fonction pulmonaire après stimulation par le LPS

Par la suite, nous avons voulu étudier plus précisément l'implication de *S100B* dans les phénotypes observés chez la lignée Ms1Yah. Pour cela, nous avons d'abord effectué des mesures de la fonction respiratoire sur des souris déficientes en *S100B*.

Nous avons entrepris deux types d'analyses. La première chez les souris $S100B^{+/-}$. Ces souris possèdent, comme les Ms1Yah, une seule copie du gène $S100B$. Puis une seconde analyse en absence totale de $S100B$ fonctionnelle chez des souris $S100B^{-/-}$.

Les souris $S100B^{+/-}$ stimulées au LPS montrent une tendance à la diminution de l'HRA par rapport aux souris B6. Les valeurs de PenH entre les souris contrôles et hétérozygotes diffèrent principalement entre 110 et 185min, et au niveau du pic maximum de la réponse au LPS (Figure 31). Cependant, la réponse est variable d'un individu à l'autre, et les tests statistiques ne sont pas significatifs sur les valeurs du PenH.

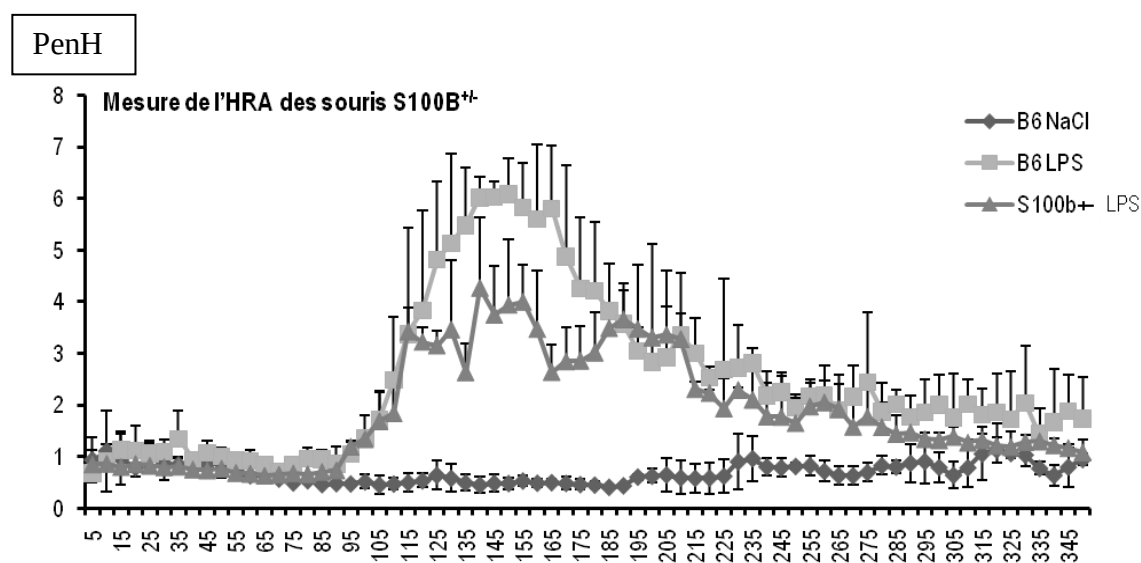


Figure 31: Mesure de la HRA chez les souris $S100B^{+/-}$ et B6 stimulées au LPS. Les souris $S100B^{+/-}$ stimulées au LPS ($n=10$) ont tendance à avoir des valeurs de PenH moins élevées que les B6 ($n=10$).

La réponse au LPS est caractérisée chez les souris B6 par une augmentation de la valeur du PenH avec un maximum de 6,78 105min après l'instillation. Les valeurs du PenH des souris $S100B^{-/-}$ sont significativement réduites (test des variances ANOVA, $P<0,05$) avec un maximum de 2,55 100min après le choc LPS (Figure 32).

La diminution de la HRA dépend donc du nombre de copies inactivées de $S100B$. Nous sommes en présence d'un effet de dose. L'inactivation des deux copies entraîne une diminution plus importante, cette fois significative, avec une quasi absence de l'HRA se caractérisant par des valeurs extrêmement réduites du PenH à partir de 125 min. Il est

intéressant de noter qu'une faible et courte réponse est visible entre 80 et 120 min, suggérant la préservation d'un mécanisme indépendant de S100B.

L'hyper-réponse des voies aériennes serait donc la résultante d'au moins deux voies : la voie NF- κ B (Fitzgerald *et al.* 2003), et d'une autre voie S100B dépendante dont nous venons de constater l'importance.

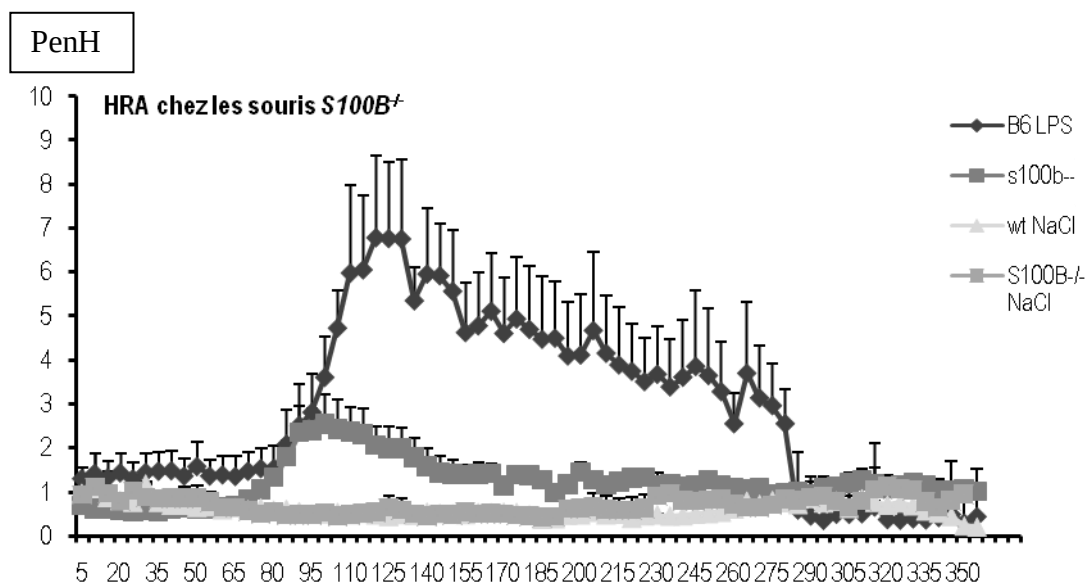


Figure 32: Mesure de l'HRA chez les souris $S100B^{-/-}$ et B6 stimulées au LPS ou NaCl. Les souris $S100B^{-/-}$ stimulées au LPS ($n=11$) ont des valeurs de PenH moins élevées que les B6 ($n=10$) (Anova, $P<0,05$).

C. Etude de la réponse inflammatoire, induite par le LPS, chez les souris $S100B^{+/-}$ et $S100B^{-/-}$

Nous nous sommes ensuite demandé si S100B intervenait uniquement dans l'hyper-réponse des voies aériennes, ou si comme d'autres protéines de la famille des S100 elle interviendrait aussi dans l'inflammation (Marenholz *et al.* 2004).

1. Analyse de la réponse inflammatoire dans les BALFs

L'inflammation des poumons des souris $S100B^{+/-}$ et $S100B^{-/-}$ a été évaluée par le recrutement des neutrophiles, la production des cytokines et l'activité MPO.

Nous avons d'abord étudié les types cellulaires recrutés dans les BALFs. Le nombre total de cellules recrutées dans les BALFs, augmente avec le LPS, mais ne montre aucune différence entre les souris B6, $S100B^{+/-}$ et $S100B^{-/-}$. Sur 200 cellules comptées, les macrophages sont bien majoritaires en absence de stimulation LPS. Le LPS induit un recrutement des neutrophiles au site de l'inflammation. La perte même partielle, de fonction de S100B ne modifie pas le nombre de neutrophiles recrutés par le LPS entre les souris $S100B^{+/-}$, $S100B^{-/-}$ et contrôles (*Figure 33*).

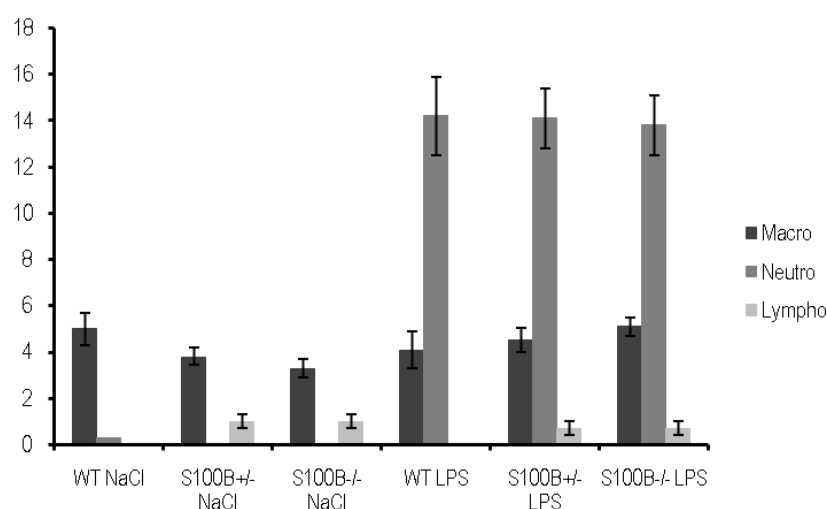


Figure 33: Caractérisation des différents types cellulaires présents dans les BALFs des lignées B6 et $S100B^{-/-}$. Le LPS n'induit aucune différence dans le recrutement des neutrophiles entre les deux lignées et les contrôles.

Ensuite nous avons mesuré les concentrations en cytokines pro-inflammatoires. Le LPS entraîne une augmentation des concentrations d'IL-6 et de TNF- α . La perte d'une ou des deux copies du gène $S100B$ n'entraîne pas de modifications dans la sécrétion des cytokines dans les BALFs. (*Figure 34*). Ce résultat est en accord avec le précédent.

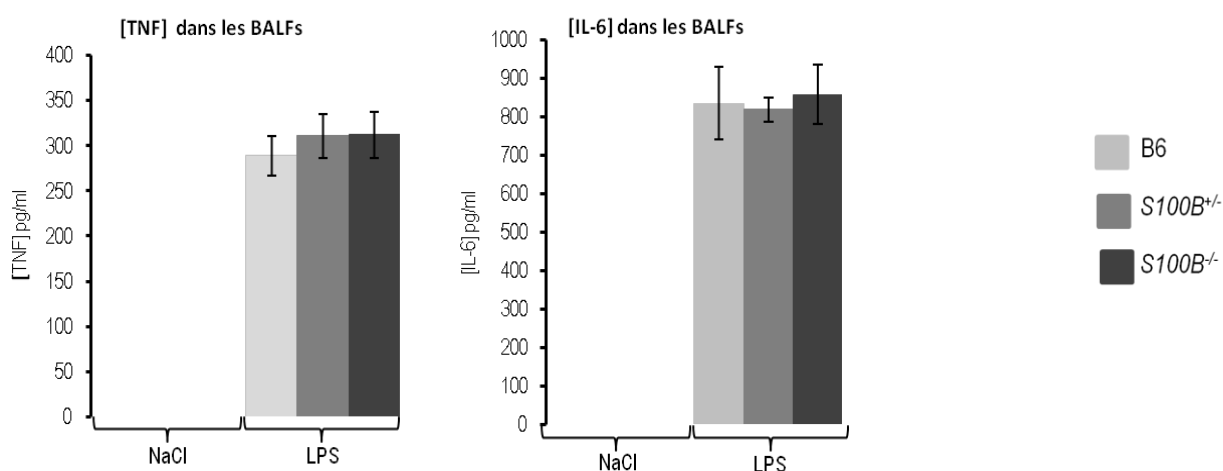


Figure 34: Caractérisation de la réponse inflammatoire induite par le LPS, dans les BALFs des souris B6 (gris clair), $S100B^{+/-}$ (gris) et $S100B^{-/-}$ (gris foncé). Le LPS induit la même augmentation des concentrations en IL-6 et TNF- α chez les B6, les $S100B^{+/-}$ et les $S100B^{-/-}$.

Le dernier paramètre mesuré reflétant l'inflammation des poumons est l'activité MPO, qui montre l'activité des neutrophiles.

Le LPS induit bien une augmentation de l'activité MPO par rapport au NaCl. Ce paramètre ne montre pas non plus de différence entre les souris $S100B^{+/-}$, $S100B^{-/-}$ et les contrôles (Figure 35), ce qui est en accord avec le résultat observé sur le recrutement des neutrophiles.

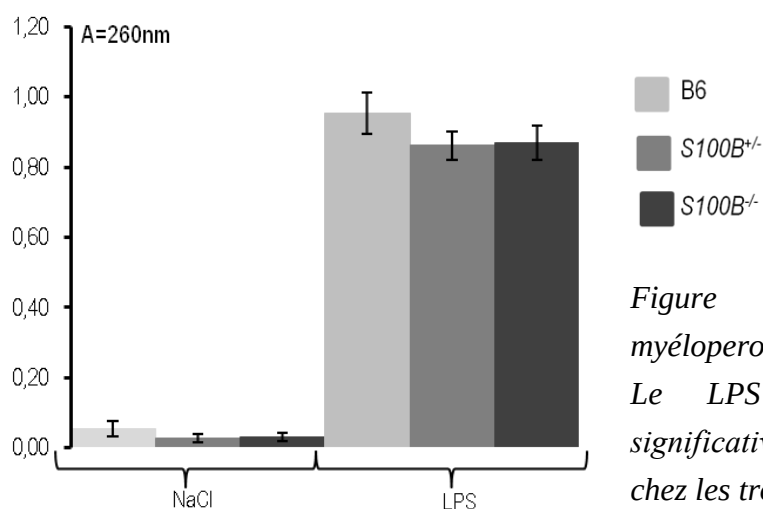


Figure 35: Mesure de l'activité myéloperoxydase (Absorbance : 460 nm). Le LPS induit une augmentation significative de l'activité MPO à la fois chez les trois lignées.

2. Analyse de la réponse inflammatoire systémique

Cette mesure sert de contrôle au bon déroulement de la sensibilisation au LPS puisque l'on doit retrouver une augmentation de la concentration en cytokines pro-inflammatoire dans le sérum.

La mesure des concentrations des cytokines par ELISA, montre que la solution saline n'entraîne aucun passage d'IL-6 ni de TNF- α dans la circulation sanguine. Le LPS induit une augmentation des concentrations d'IL-6 et de TNF- α dans le sérum, mais sans différence entre les souris $S100B^{+/-}$, $S100B^{-/-}$ et contrôles (*Figure 36*). La concentration en TNF- α est 3 fois moins importante dans le sérum que dans les BALFs, et la concentration en IL-6 est réduite d'un facteur 4. Cela est dû au fait que les cytokines sont d'abord produites au site de l'inflammation avant de passer dans la circulation sanguine.

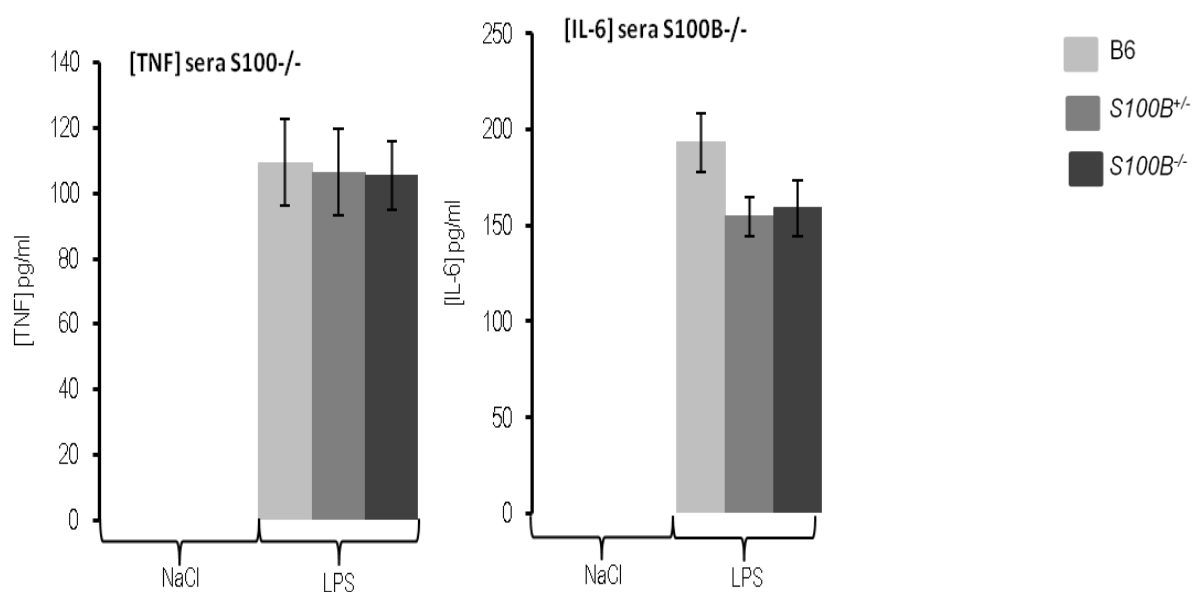


Figure 36: Caractérisation de la réponse inflammatoire induite par le LPS, dans le sérum des souris $S100B^{+/-}$, $S100B^{-/-}$ et contrôles. Le LPS induit une augmentation de la concentration en IL-6 et TNF- α , dans le sérum des trois lignées.

Au vu de ces résultats, S100B ne semble pas intervenir dans l'inflammation induite par le LPS. La seule différence observée entre les souris *S100B*^{+/-} et *S100B*^{-/-} se situe au niveau de l'HRA induite par le LPS. En effet, l'inactivation d'une copie de *S100B* tend à diminuer l'hyper-réponse des voies aériennes, alors que l'effet est nettement plus marqué en l'absence des deux copies du gène *S100B*, suggérant un effet dose dépendant de S100B.

Les souris Ms1Yah présentent une augmentation de la réponse inflammatoire mais une diminution de l'HRA après stimulation par le LPS. Les souris *Prmt2*^{+/-} montrent la même altération de l'inflammation pulmonaire, cependant la difficulté respiratoire induite par le LPS est augmentée chez ce modèle. Quant aux souris *S100B*^{-/-} et *S100B*^{+/-}, elles ne montrent aucune différence par rapport aux contrôles B6 dans la production des cytokines, le recrutement des neutrophiles et l'activité MPO. Toutefois, l'inactivation totale du gène *S100B* rend les souris moins sensibles à la détresse respiratoire induite par le LPS.

D. Etude de la localisation de la protéine S100B dans le poumon

L'hyper-réponse des voies aériennes est due à la contraction des cellules du muscle lisse. Ce mécanisme nécessite entre autre la présence des ions calcium, à la fois au niveau de la transmission de l'acétylcholine au niveau de la synapse neuromusculaire ainsi que lors de la contraction des cellules musculaires. Etant donné que S100B est une protéine de liaison au calcium, il est probable qu'elle joue un rôle soit au niveau de la transmission de l'information nerveuse, soit directement dans la contraction des cellules du muscle lisse.

Par ailleurs, en 2006, Morbini *et al.* ont montré que la protéine S100B est localisée dans les nerfs péri bronchiaux et dans les cellules dendritiques interstitielles dans les poumons humain sains. Il devient intéressant de localiser la protéine dans les poumons de souris chez lesquelles on a induit une HRA.

Pour tenter de mieux comprendre l'implication de *S100B* dans l'HRA, en collaboration avec le service d'histopathologie de l'ICS (Strasbourg), nous avons réalisé un marquage de la protéine S100B à la fois en chromogène et en fluorescence. Lors de l'étude de la cinétique d'apparition de S100B après l'instillation de LPS, nous avons vu que la protéine est concentrée à partir de 2h. Pour être sûr de bien voir S100B, les premières expériences de

mise au point ont été réalisées à partir d'échantillons prélevés 4h après l'instillation de LPS. Ces expériences sont encore au stade de la mise au point.

Dans un premier temps nous avons réalisé un marquage en chromogène sur coupe de poumons. Celui-ci révèle des cellules marquées S100B, dont le nombre augmente après la stimulation LPS (*Figure 37*). Cette même figure ne semble pas montrer de marquage des cellules du muscle lisse, et aucun nerf n'est visible.

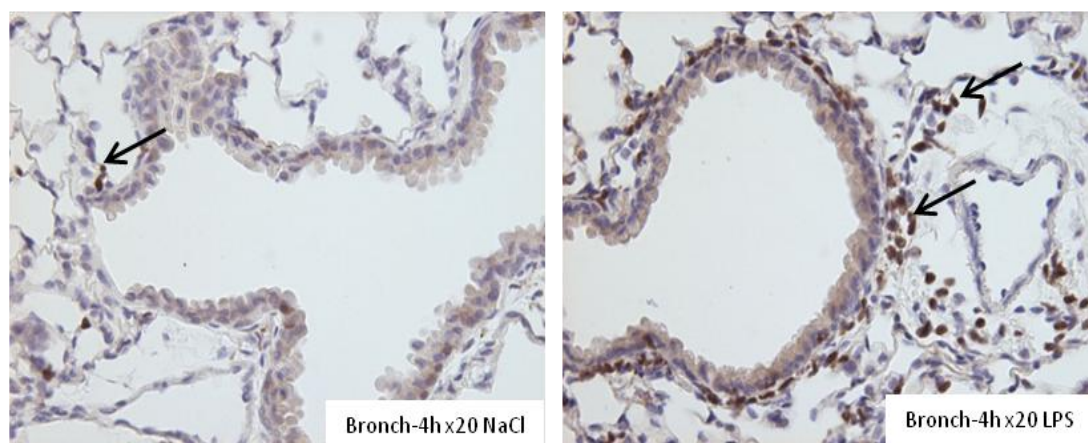


Figure 37: Détection de l'expression de S100B dans les bronches de souris B6 stimulée au NaCl (à gauche) ou au LPS (à droite). Le nombre de cellules exprimant S100B, marquées par immunohistochimie, augmente de manière très importante 4h après l'action du LPS.

Dans un souci de mise au point des marquages, nous avons réalisé un marquage sur des coupes d'intestin où les nerfs sont facilement visibles. Sur la figure 38 nous pouvons voir deux nerfs indicés par les flèches noires. Le marquage S100B semble co-localiser avec ces nerfs.

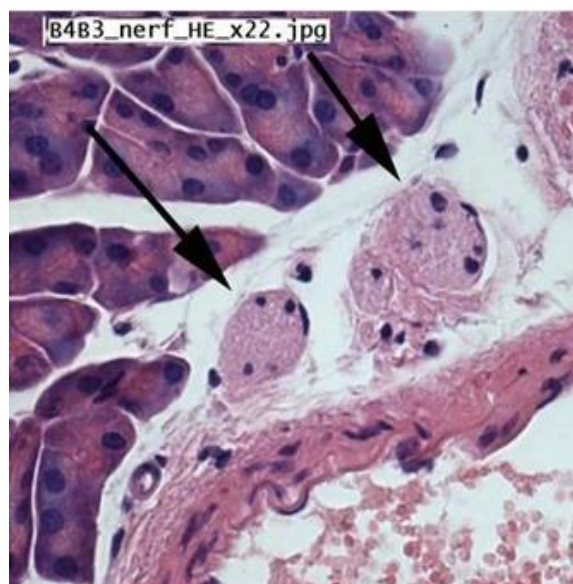


Figure 38: détection par immunohistochimie de S100B sur coupe d'intestin. Les flèches montrent deux nerfs. S100B semble localisé dans les nerfs.

Afin de valider ces données, nous avons réalisé un marquage en fluorescence. Tout d'abord, nous avons réalisé un marquage des nerfs par un anti-GFAP (vert). La figure 39 montre en A le marquage des noyaux cellulaires au DAPI, en B le marquage anti-GFAP des nerfs, en C le marquage S100B et en D la superposition des marquages nerfs/S100B. S100B étant connu pour être localisé dans les astrocytes (Higashino *et al.* 2009), nous avons réalisé un marquage de l'hippocampe comme témoin positif du marquage S100B. Le marquage S100B dans l'hippocampe montre qu'il est bien spécifique (*Figure 39 C hyppo*). Le marquage GFAP, ne semble pas spécifique (*Figure 39 B*), et n'a pas marqué les poumons. La figure 40 C montre un marquage de S100B dans les nerfs et les plexus nerveux d'Auerbach et de Meissner de l'intestin. Ce résultat est intéressant puisque ces plexus sont localisés dans le muscle lisse et la sous-muqueuse de l'intestin. Cette observation va dans le même sens que le résultat obtenu en chromogène, cependant, le marquage GFAP n'étant pas spécifique, il ne permet pas de conclure de façon certaine quant à la co-localisation de S100B avec les nerfs,

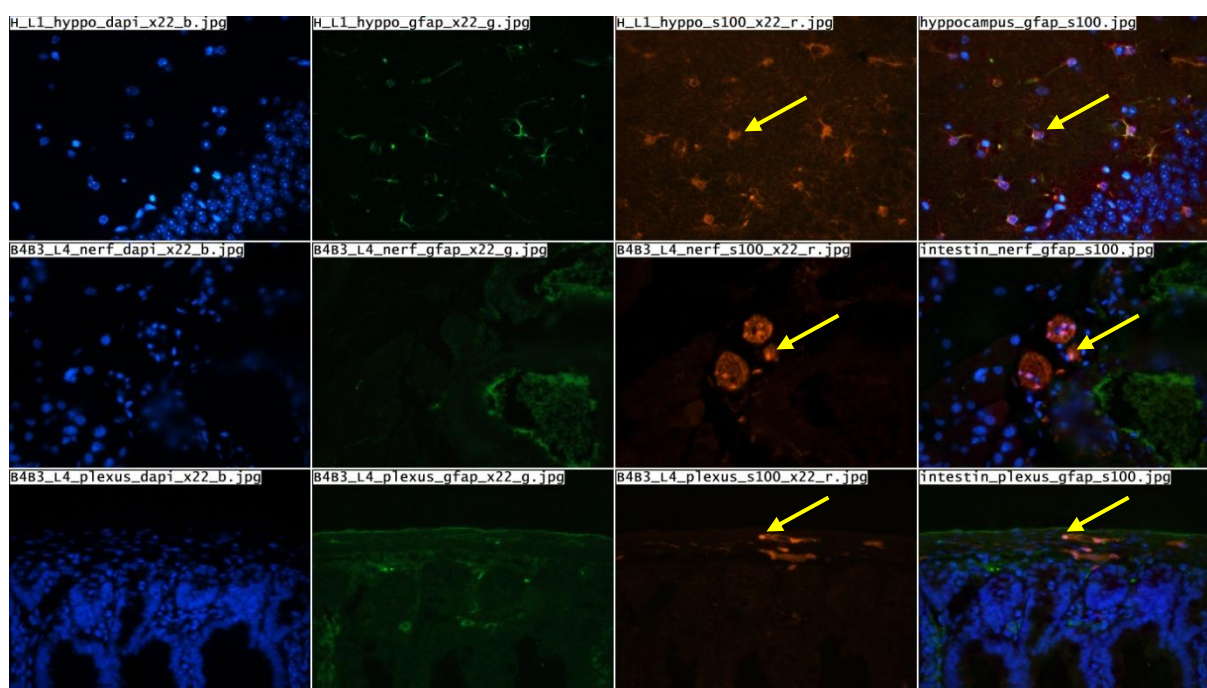


Figure 39: Marquage des noyaux par le DAPI (bleu) (A), des nerfs par un anti-GFAP (vert) (B), de S100B (anti-S100B rouge) (C) et superposition des marquages nerfs/S100B (D). S100B semble localisé dans les nerfs.

Ensuite, nous avons réalisé un marquage des cellules du muscle lisse par un anti-actine (vert). La figure 40 (intestin et poumons) montre en A le marquage des noyaux cellulaires au DAPI, en B le marquage anti-actine des muscles lisses, en C le marquage S100B et en D la superposition des marquages muscle/S100B. Cette expérience révèle un marquage S100B à la

fois dans les nerfs, les alvéoles et des bronches. Cependant, ce marquage ne co-localise pas avec les muscles lisses des bronches et des vaisseaux, ce qui confirme l'observation réalisée avec le marquage chromogène.

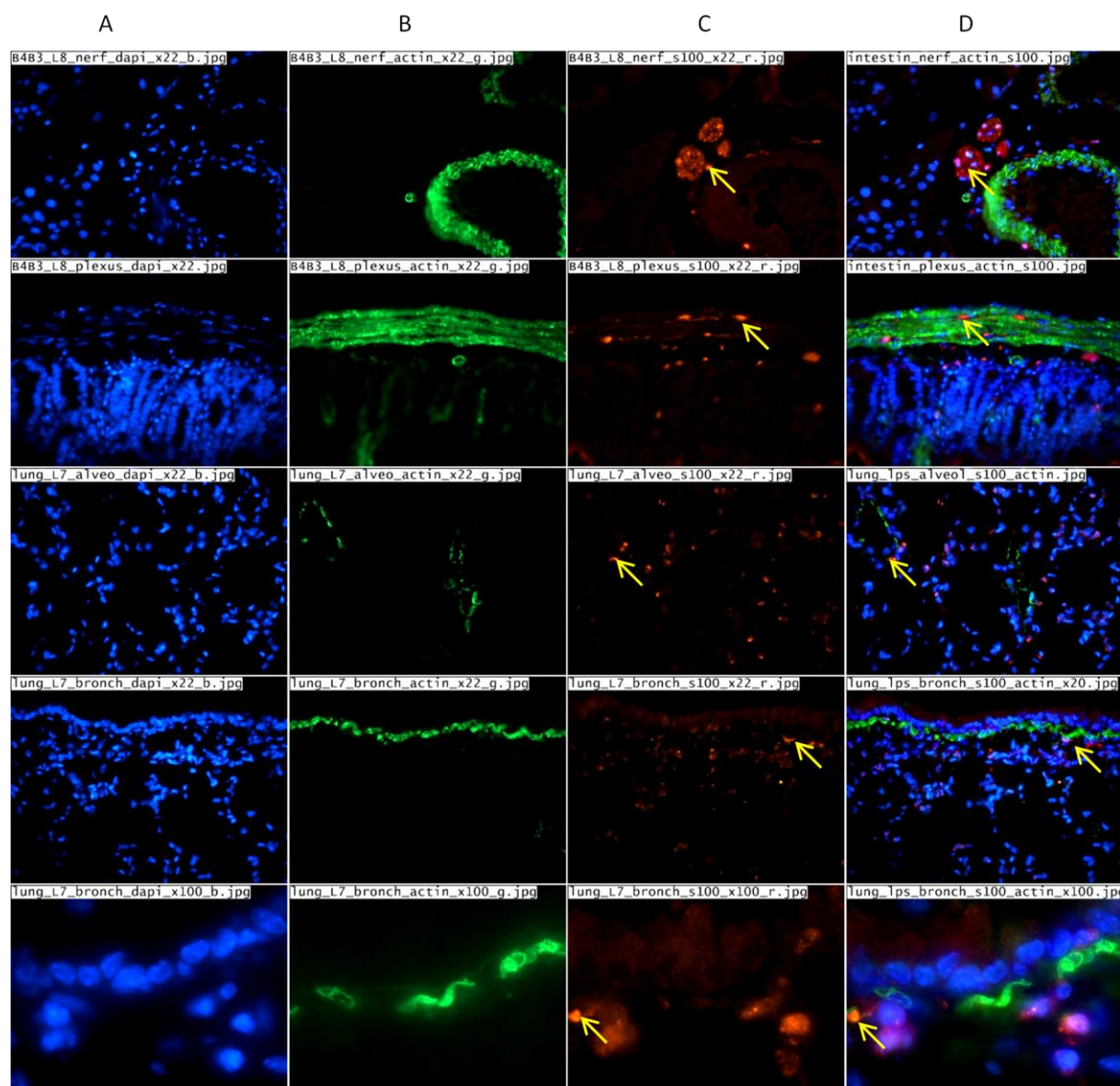


Figure 40: Marquage des noyaux par le DAPI (bleu) (A), des cellules musculaires par un anti-actine (vert) (B), de S100B (anti-S100B rouge) (C) et superposition des marquages muscle/S100B (D). S100B n'est ni localisé dans les cellules du muscle lisse des bronches ni des vaisseaux.

Ces expériences préliminaires montrent que S100B n'est pas localisé dans les cellules du muscle lisse, mais qu'il serait présent dans les nerfs, ce qui serait en accord avec les résultats de Morbini *et al.* (2006) obtenus chez l'homme.

IV. Utilisation d'un anticorps pour bloquer l'activité S100B

L'inactivation du gène *S100B* conduit à une amélioration de la fonction pulmonaire, après l'instillation de LPS, et cela sans modifier la réponse inflammatoire. Nous nous sommes alors posé la question de l'efficacité que pourrait avoir un anticorps anti-S100B sur l'hyper-réponse des voies aériennes induite par le LPS.

A. Test de l'anticorps anti-S100B chez des souris sauvages B6

En 2004, Bozinovski *et al.* utilisent un anticorps anti-S100A8 in vivo, pour montrer que le recrutement des neutrophiles induit par le LPS dépend en partie de la chimiokine S100A8. Les auteurs utilisent 2mg d'anticorps pour avoir une réponse maximum. Il est donc possible, grâce à un anticorps de bloquer l'activité des protéines de la famille S100.

En plus des groupes contrôles ayant reçu le LPS (n=4), ou le NaCl (n=3), deux groupes de neuf souris sauvages B6 ont reçu 1mg et 2mg d'anticorps anti-S100B, par injection en i.p. 16h avant l'instillation de LPS. La fonction pulmonaire de ces souris a été surveillée par pléthysmographie. 24h après la sensibilisation les souris ont été sacrifiées et l'inflammation a été mesurée par la concentration en cytokines IL-6 et TN- α dans le sérum et les BALFs, le recrutement des neutrophiles et l'activité MPO.

1. Etude de la fonction pulmonaire

La figure 41 illustre l'HRA en fonction de la quantité d'anticorps. Il apparaît que 1mg d'anticorps est suffisant pour réduire significativement la valeur maximum du PenH des souris B6 qui ont reçu l'anti-S100B (3,01 à 125min) par rapport à celles ayant reçu uniquement le LPS (5,95 à 110min). L'effet est un peu plus marqué pour 2mg puisque la valeur du PenH ne dépasse pas 2,52 125min après l'instillation de LPS (Anova *P<0,05).

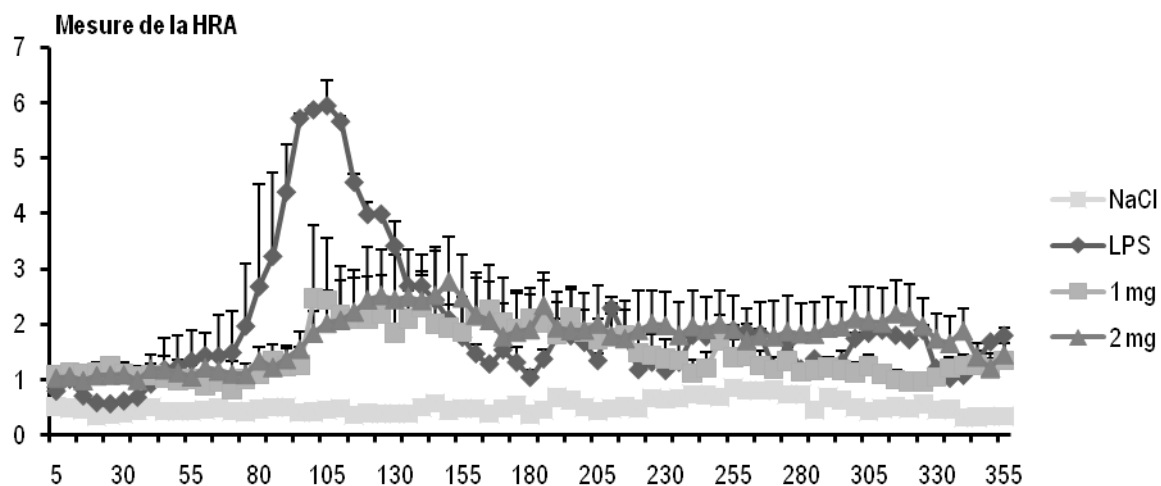


Figure 41: Mesure de l'HRA chez des souris B6 stimulées au LPS ou NaCl, ayant reçu 1 ou 2mg d'anti-S100B. L'anticorps favorise une diminution de la résistance pulmonaire induite par le LPS (Anova, $P < 0,05$), à partir de 1mg d'anti-S100B.

2. Analyse de la réponse inflammatoire dans les BALFs

L'inflammation des poumons des souris a été évaluée par le recrutement des neutrophiles, la production des cytokines et l'activité MPO.

Le nombre de cellules total recrutées dans les BALFs, augmente avec le LPS, mais ne montre aucune différence entre les souris B6 ayant reçu l'anticorps et celles ayant reçu le LPS seul. Le nombre de neutrophiles recrutés par le LPS ne diffère pas, que les souris aient reçu l'anticorps ou non (Figure 42).

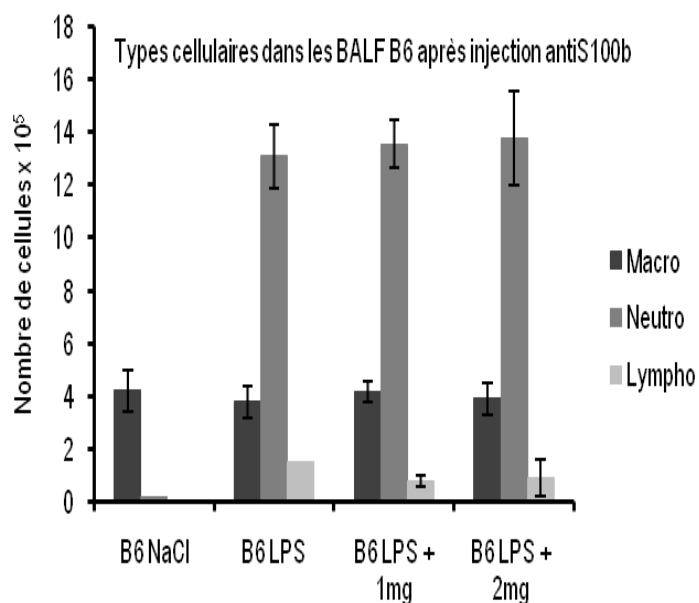


Figure 42: Caractérisation des différents types cellulaires présents dans les BALFs des souris B6 traitées ou non avec l'anti-S100B. Le LPS n'induit aucune différence dans le recrutement des neutrophiles entre les groupes avec ou sans anticorps.

Nous avons ensuite mesuré les concentrations en IL-6 et TNF- α dans les BALFs. L'injection de l'anticorps, quelle que soit la quantité utilisée, ne modifie pas les concentrations des cytokines produites par rapport aux souris ayant reçu le LPS seul (Figure 43).

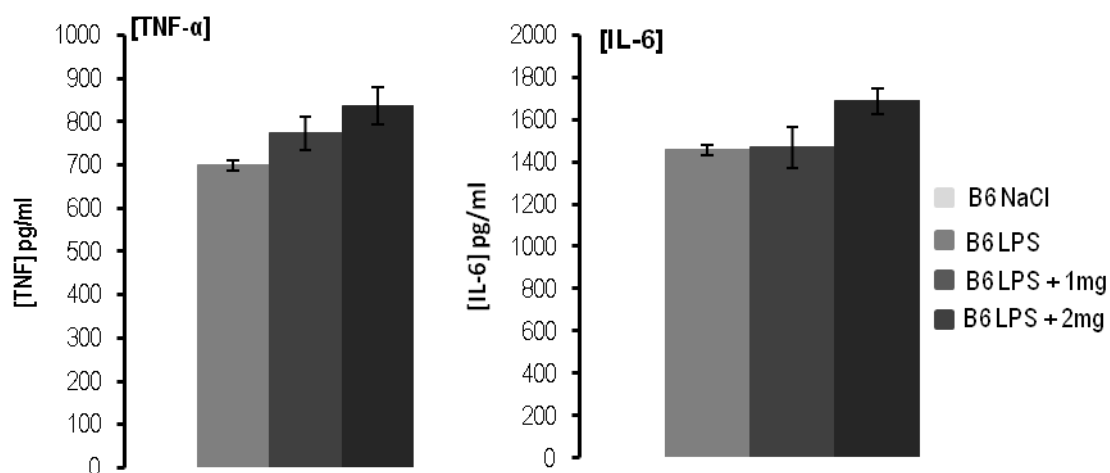


Figure 43: Caractérisation de la réponse inflammatoire induite par le LPS, dans les BALFs des souris B6 ayant reçu ou non l'anti-S100B. Le LPS induit une augmentation de la concentration en IL-6 et TNF- α , aussi bien chez les B6 ayant reçu l'anticorps que chez celles ayant reçu le LPS seul.

L'injection de 1 ou 2 mg d'anti-S100B ne modifie pas l'activité MPO des souris par rapport à celles qui n'ont pas reçu l'anticorps (*Figure 44*).

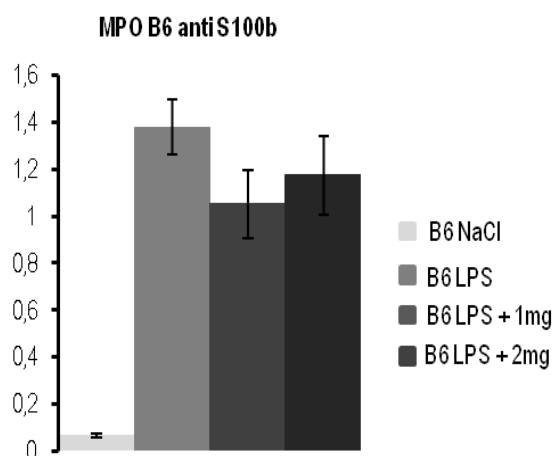


Figure 44 : Mesure de l'activité myéloperoxydase (Absorbance : 460 nm). Le LPS la même augmentation de l'activité MPO chez les souris B6, qu'elles aient ou non reçu l'anticorps.

L'anticorps anti-S100B injecté aux souris avant l'instillation de LPS, permet de retrouver le phénotype des souris *S100B^{-/-}*, c'est-à-dire une diminution de la valeur du PenH, bien que la réponse inflammatoire soit correctement mise en place.

B. Test de l'anticorps anti-S100B chez les souris *Prmt2^{+/-}*

Les souris *Prmt2^{+/-}* présentent une augmentation de la valeur du PenH par rapport aux souris B6, après stimulation par le LPS. Au vu des résultats obtenus chez les B6 avec le traitement anticorps, je me suis posé la question de l'efficacité de l'anti-S100B sur l'HRA des souris *Prmt2^{+/-}*.

Deux groupes de dix souris ont reçu le LPS seul ou LPS + anti-S100B. Nous avons choisi d'utiliser 2mg d'anticorps afin d'avoir le meilleur résultat possible. Les groupes contrôles sont constitués de 5 souris pour le groupe B6 LPS et trois individus pour le groupe B6 NaCl.

1. Etude de la fonction pulmonaire

L'injection de l'anti-S100B au souris *Prmt2^{+/-}* avant l'instillation de LPS, permet de réduire significativement la valeur du PenH maximum, à la fois par rapport aux souris *Prmt2^{+/-}* et par rapport aux B6 qui n'ont pas reçu l'anticorps (*Figure 45*, Anova *P<0,05).

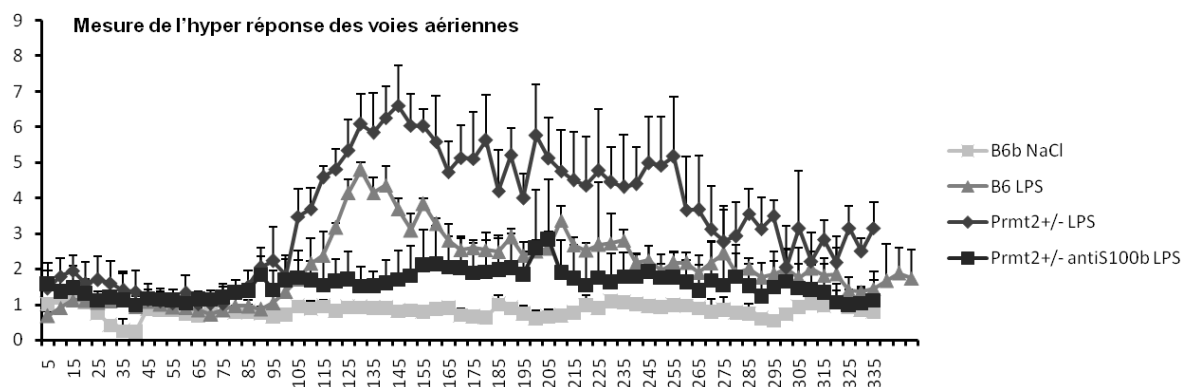


Figure 45: Mesure de l'HRA chez des souris $Prmt2^{+/-}$ stimulées au LPS, ayant reçu ou non 2mg d'anti-S100B. L'anticorps favorise une diminution de l'HRA induite par le LPS (Anova, $*P<0,05$).

2. Etude de la réponse inflammatoire dans les BALFs

L'inflammation des poumons des souris a été évaluée par le recrutement des neutrophiles, la production des cytokines et l'activité MPO.

Le LPS induit un recrutement des neutrophiles, aussi bien chez les souris contrôles que $Prmt2^{+/-}$ traitées ou non avec l'anti-S100B. Comme déjà montré, le nombre de neutrophiles recrutés chez les souris $Prmt2^{+/-}$ est plus important que chez les B6 LPS. L'anticorps ne modifie donc pas le recrutement cellulaire lors de l'inflammation des souris $Prmt2^{+/-}$ (Figure 46)

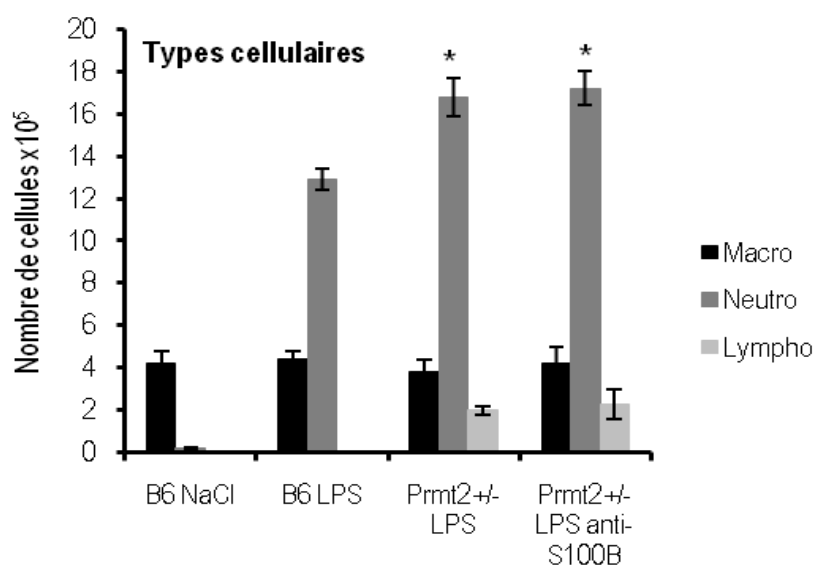


Figure 46: Caractérisation des différents types cellulaires présents dans les BALFs des souris B6 et *Prmt2*^{+/-} ayant reçu ou non l'anti-S100B. L'anti-S100B ne modifie pas le phénotype inflammatoire précédemment observé chez les souris *Prmt2*^{+/-} (test de Student **P* < 0,05).

Le dosage de l'activité MPO, montre lui aussi, que le traitement anti-S100B chez les souris *Prmt2*^{+/-} ne modifie pas le phénotype déjà observée. En effet, les souris *Prmt2*^{+/-} qui ont reçu l'anticorps montrent la même augmentation significative, de l'activité MPO, que les souris *Prmt2*^{+/-} qui ont reçu seulement le LPS par rapport aux souris contrôles (Figure 47).

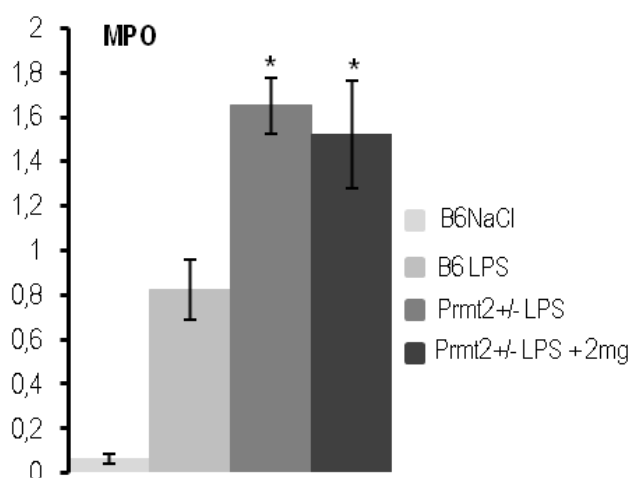


Figure 47: Mesure de l'activité myéloperoxydase (Absorbance : 460 nm). L'anti-S100B ne modifie pas le phénotype inflammatoire précédemment observé chez les souris *Prmt2*^{+/-} (test de Student **P* < 0,05).

Le LPS induit une augmentation de la concentration en TNF- α et IL-6 dans les BALFs. L'anticorps n'agit pas sur la production des cytokines puisque l'on retrouve bien une augmentation de la concentration des deux molécules chez les souris *Prmt2*^{+/-}, qu'elles aient ou non reçu l'anticorps (Figure 48).

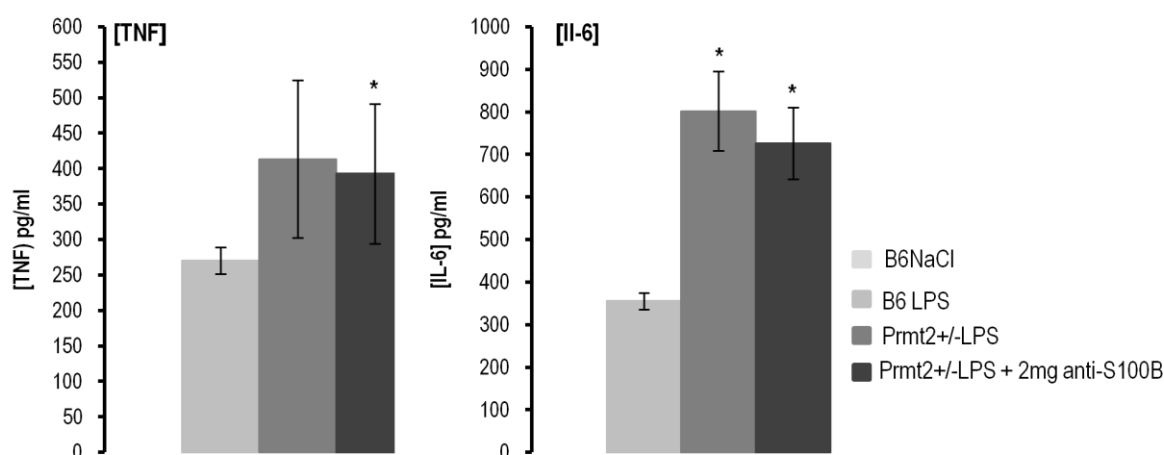


Figure 48: Caractérisation de la réponse inflammatoire induite par le LPS, dans les BALFs des souris B6 et *Prmt2*^{+/-} ayant reçu ou non l'anti-S100B. L'anti-S100B ne modifie pas le phénotype inflammatoire précédemment observé chez les souris *Prmt2*^{+/-} (test de Student * $P < 0,05$).

Les résultats de l'utilisation de l'anticorps anti-S100B chez les souris *Prmt2*^{+/-}, montrent bien l'implication de *S100B* dans l'HRA et confirment l'implication de ces deux gènes dans les phénotypes des souris Ms1Yah. De plus ces résultats confirment que *Prmt2* agit sur la réponse inflammatoire de façon indépendante de *S100B*, alors que ces deux gènes peuvent être liés dans l'HRA.

V. Utilisation de l'anti-S100B dans un modèle d'asthme

Cette étude est menée en collaboration avec Julien Becker, de la plateforme de phénotypage de l'ICS de Strasbourg, qui réalise la sensibilisation ovalbumine ainsi que la mesure de l'HRA lors du challenge à la métacholine.

Afin de vérifier le potentiel bronchodilatateur de l'anti-S100B, nous avons décidé de tester son efficacité dans un modèle murin d'asthme. Pour cela, nous avons choisi la souche BALB/cJ, classiquement utilisée dans les études sur l'asthme. Lors d'un challenge à la

métacholine, ces souris développent une HRA et une inflammation des tissus après sensibilisation à l'ovalbumine.

L'asthme allergique pulmonaire nécessite la mise en place d'une réponse inflammatoire de type LTh2 (Lymphocytes T helpers). Ces cellules produisent en majorité de l'IL-4 responsable du recrutement des éosinophiles au site de l'inflammation. Le but de ce système est de favoriser la production des anticorps, mais il est aussi responsable de l'hyperactivité broncho-pulmonaire, ainsi que de l'activation des mastocytes.

Les résultats présentés dans cette partie sont relativement récents et les données présentées dans ce mémoire ne sont que préliminaires.

A. Suivi de la production de S100B

Le protocole étant long (20 jours pour la sensibilisation à l'ovalbumine et challenge au jour 21), nous avons commencé par réaliser une cinétique avec des groupes de 5 souris afin de vérifier, par dosage Elisa la présence de S100B dans le sérum et les BALFs des souris. Les souris ont toutes été sensibilisées à l'ovalbumine. Un groupe a ensuite reçu des doses croissantes de métacholine, allant de 0,05 à 0,3M.

Les souris ont été sacrifiées à t=0 (contrôles), 2h, 6h et deux groupes à 24h : un sans métacholine et un avec. Nous avons ensuite prélevé les sérums et les BALFs afin de suivre l'apparition de S100B et le recrutement des éosinophiles.

Etrangement, lors de ces mesures, je n'ai pas trouvé de S100B dans les BALFs, mais une forte concentration dans le sérum. La métacholine permet d'amplifier la réponse, puisque les souris ayant reçu la métacholine montrent une concentration de S100B supérieure à celle trouvée chez les souris sans métacholine. La concentration en S100B sérique chute sensiblement entre 6h et 24h (*Figure 49*). Afin d'analyser plus précisément la cinétique et de voir si chaque sensibilisation entraîne une production de S100B, nous avons relancé une cinétique avec plus de prélèvements.

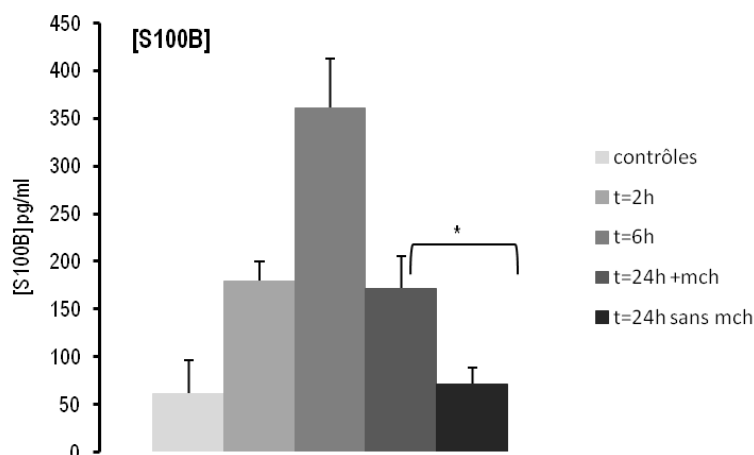


Figure 49: Cinétique de la concentration en S100B dans le sérum de souris BALB/cJ sensibilisées à l'ovalbumine lors de la dernière sensibilisation. La métacholine renforce la production de S100B 24H après la dernière sensibilisation ovalbumine.

B. Action de l'anticorps sur l'hyper-réponse des voies aériennes

Nous avons ensuite testé l'efficacité de l'anticorps anti-S100B dans le modèle d'asthme. Afin de mettre les conditions au point, nous avons d'abord réalisé une expérience sur deux groupes de 5 individus. Les deux groupes ont été sensibilisés à l'ovalbumine et ont reçu des doses croissantes de métacholine durant la mesure de l'HRA. Un groupe a reçu 2mg d'anticorps, 16h avant la dernière sensibilisation ovalbumine.

Nous observons que plus la dose de métacholine est importante, plus l'effet de l'anticorps est marqué. En effet, les souris du groupe qui a reçu l'anticorps ont tendance à avoir des valeurs de PenH inférieures par rapport aux souris du groupe contrôle (Figure 50). Afin de vérifier ces résultats, une nouvelle expérience, avec des groupes de n=7 souris sont actuellement en cours, ce qui portera les effectifs à n=12 individus.

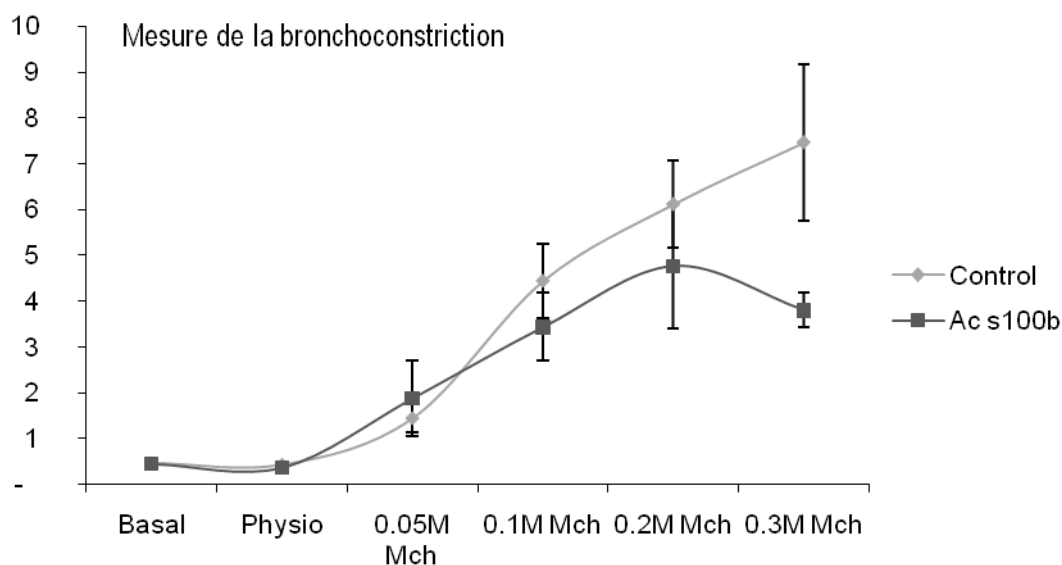


Figure 50: Mesure de l'HRA chez un modèle murin d'asthme. L'anticorps a tendance à faire diminuer les valeurs du PenH chez les souris ($n=5$) du groupe qui a reçu l'anti-S100B.

L'inhibition de la protéine S100B favorise donc une diminution de l'hyper-réponse des voies aériennes, à la fois dans un modèle d'inflammation au LPS et dans un modèle d'asthme, ce qui met en évidence l'implication de S100B dans ce phénomène. De plus, ces résultats encourageants laissent entrevoir l'impact thérapeutique d'une molécule capable d'inhiber l'activité de S100B, notamment dans les maladies bronchoconstrictives telles que l'asthme.

Conclusions-Discussion

Le modèle murin de monosomie pour la région *Prmt2-Col6a1* homologue au HSA21, développe une réponse inflammatoire accrue en réponse à une stimulation au LPS. Cependant, chez ce même modèle, l'application locale de LPS induit une HRA nettement moins importante que chez les souris contrôles. Afin de comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la réponse au LPS, je me suis intéressée plus particulièrement aux gènes *Prmt2* et *S100B*.

I. La réponse inflammatoire

En réponse au LPS, la voie TLR4/Myd88 est activée et entraîne l'ubiquitination puis la dégradation de l'inhibiteur I κ B- α . NF- κ B ainsi libéré est dirigé dans le noyau où il active la transcription de ses gènes cibles et notamment les cytokines pro-inflammatoires ainsi que celle d'I κ B- α . La néo synthèse de l'inhibiteur va engendrer une diminution de la liaison du facteur NF- κ B à l'ADN et conduit ainsi à l'extinction de la signalisation et à la diminution de l'inflammation.

La mise en place de l'inflammation résulte de l'activation du système réticulo-endothéliale aboutissant à la synthèse de différents médiateurs qui ont une action locale, mais aussi générale. Parmi ces médiateurs, on trouve les cytokines pro-inflammatoires dont les principales sont l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- α . Elles sont responsables de l'amplification de la réponse inflammatoire et de la majeure partie des manifestations systémiques (Tracey et Lowry, 1990). Ces cytokines augmentent la synthèse des protéines de la phase aiguë en augmentant la concentration des ARNm correspondants par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels. L'IL-6 est le principal médiateur. L'IL-1 et le TNF- α entraînent une réponse réduite mais agissent essentiellement en stimulant la production d'IL-6 (Fey *et al.* 1994). Au vu de l'importance du rôle joué par IL-6 et TNF- α , j'ai choisi de mesurer l'inflammation locale et systémique en dosant ces deux cytokines.

1. Rôle du gène *Prmt2* dans la réponse inflammatoire

Le gène *Prmt2* fait partie de la famille des Protéines Arginine MéthylTransférases. Ces protéines sont capables de modifier la structure de la chromatine et de réguler la transcription.

Prmt2 est connu pour intervenir dans différentes voies de signalisations, notamment dans l'apoptose (Ganesh *et al.* 2006), dans la régulation de la transcription dépendante des oestrogènes d'une part (Qi *et al.* 2002,) et de NF-κB d'autre part (Yoshimoto *et al.* 2006). *Prmt2* inhibe la transcription NF-κB dépendante en créant une accumulation de l'inhibiteur IκB-α dans le noyau, ce qui entraîne une diminution de la liaison de NF-κB à l'ADN. Cependant, son mécanisme d'action dans l'inflammation n'est toujours pas entièrement décrypté.

Nous avons émis l'hypothèse qu'une diminution du nombre de copies de *Prmt2*, dans le modèle Ms1Yah, permettrait d'expliquer l'augmentation de la production des cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-6 et le TNF-α.

L'utilisation des souris *Prmt2*^{+/-}, stimulées au LPS montre que ces souris présentent le même type de réponse inflammatoire que celle observée chez les souris Ms1Yah. En effet, les souris *Prmt2*^{+/-} présentent une augmentation de la concentration en IL-6, à la fois dans les BALFs et dans les sérums. La concentration en TNF-α est quant à elle augmentée dans les BALFs, mais pas dans le sérum. Cependant, ces résultats sont renforcés par le fait que le nombre de neutrophiles actifs, recrutés dans les BALFs et l'activité MPO augmentent chez les souris *Prmt2*^{+/-}, par rapport aux souris contrôles. Toutefois, la même expérience menée à partir de macrophages, montre qu'*in vitro* il faut inactiver les deux copies du gène *Prmt2* pour observer une augmentation de la concentration en cytokines pro-inflammatoire. Ce résultat peut s'expliquer de deux manières. Premièrement, il suggère l'implication d'au moins un autre gène de la région *Prmt2-Col6a1* pour expliquer l'augmentation de la production d'IL-6 et de TNF-α par les macrophages des souris Ms1Yah. Ensuite, il pourrait y avoir un effet incomplet de la mutation dans le gène *Prmt2* chez les hétérozygotes. Ainsi l'allèle *Prmt2*^{+/-} porté par les hétérozygotes *Prmt2*^{+/-} serait moins sévère que l'allèle *Prmt2* porté par les souris Ms1Yah, ce dernier correspondant à une délétion quasi-totale du gène.

L'analyse par Q-PCR, a permis de montrer que *Prmt2* intervient dans la régulation de l'expression des cytokines IL-6 et TNF-α. Le gène *Prmt2* comporte 10 exons. Les primers

utilisés pour détecter l'expression de *Prmt2* sont complémentaires des exons 7 et 8. Dans la délétion portée par la lignée Ms1Yah, *Prmt2* est délété pour les exons 1 à 6. L'allèle porté par la lignée *Prmt2*^{+/-} comprend une délétion partielle des exons 4 et 6, et le remplacement de l'exon 5 par une cassette Néomycine. Chez la lignée *Prmt2*^{+/-}, il peut donc se former un transcrit incomplet à partir des éléments régulateurs du gène néomycine, qui sera détecté en Q-PCR. En théorie, les souris Ms1Yah et *Prmt2*^{+/-} possédant toutes les deux une seule copie de *Prmt2*, on s'attend à ce que ce gène soit moitié moins exprimé dans ces deux lignées par rapport aux contrôles B6.

La stimulation par le NaCl entraîne l'expression de *Prmt2*, à la fois dans les macrophages et les poumons des souris Ms1Yah, *Prmt2*^{+/-} et B6. Cela peut s'expliquer par le fait qu'en absence d'inflammation, la voie NF-κB est « éteinte », ce qui nécessite entre autre la présence *Prmt2* pour faciliter la formation des dimères NF-κB/IκB-α. Dans les macrophages stimulés au NaCl ou au LPS, l'expression de *Prmt2* est plus importante chez les souris *Prmt2*^{+/-}. Cela pourrait être expliqué par la présence d'un transcrit incomplet de *Prmt2*. Dans les poumons stimulés au NaCl, l'expression de *Prmt2* est diminuée d'un facteur 1,2 chez les souris Ms1Yah et d'un facteur 4 chez les souris *Prmt2*^{+/-} par rapport aux contrôles. Les poumons stimulés au LPS, montrent une diminution de l'expression de *Prmt2* d'un facteur 3,5 à la fois chez les souris *Prmt2*^{+/-} et Ms1Yah, par rapport aux contrôles. Ce dernier résultat va plus dans le sens où il y aurait une régulation différente de l'expression de *Prmt2* en fonction du type cellulaire, ce qui est en accord avec les résultats de Lyle *et al.* (2004) et McGraw *et al.* (2007) qui ont montré que la régulation de l'expression de ce gène est variable d'un type cellulaire à l'autre, et aussi d'un organe à un autre.

L'analyse de l'expression des gènes *IL-6*, *TNF-α* et *Prmt2* montre que l'expression des gènes des cytokines est corrélée avec une diminution du nombre de doses de *Prmt2* dans les macrophages des souris Ms1Yah et dans les poumons des souris Ms1Yah et *Prmt2*^{+/-}. Néanmoins, l'augmentation de l'expression du gène *TNF-α* dans les poumons et les macrophages des souris *Prmt2*^{+/-} est moins importante que chez les souris Ms1Yah, ce qui pourrait expliquer le fait qu'il n'y ait pas vraiment d'augmentation de la concentration de *TNF-α* en systémique chez les souris *Prmt2*^{+/-}.

Bien que les macrophages stimulés au LPS, dérivés des souris *Prmt2*^{+/-} produisent plus de cytokines, étrangement il y aussi détection d'un transcrit *Prmt2*. L'ensemble de ces résultats peut s'expliquer de différentes manières :

- Tout d'abord, ces résultats sont en accord avec le fait qu'il faille inactiver les deux copies de *Prmt2* dans les macrophages pour observer une augmentation significative de la concentration en cytokines dans le surnageant des macrophages *Prmt2*^{-/-} par rapport aux contrôles.
- L'augmentation de l'expression de *Prmt2* dans les souris *Prmt2*^{+/-} permettra de compenser la perte d'une copie du gène dans les macrophages.

L'ensemble de ces résultats montre clairement que *Prmt2* est impliqué dans la réponse inflammatoire, que c'est un gène sensible aux effets de dose, et qu'il participe à la régulation de l'expression des gènes des cytokines IL-6 et TNF- α , certainement par son rôle inhibiteur de la signalisation NF- κ B.

2. Rôle du gène *S100B* dans l'inflammation

S100B participe à l'activation de la voie NF- κ B (Valencia *et al.* 2004a), via sa liaison avec RAGE. Cela a pour conséquence l'activation des cellules immunitaires, et le recrutement des neutrophiles au site de l'inflammation (Hofmann *et al.* 1999 ; Donato *et al.* 2009). L'interaction de ses ligands (Ages) avec le récepteur RAGE induit *in vivo*, l'activation du facteur NF- κ B (Yan *et al.* 1994), la production d'IL-6, notamment dans le foie et les poumons (Schmidt *et al.* 1994) ainsi que l'expression de TNF- α (Hofmann *et al.* 1999). *S100B* étant un ligand de RAGE, il est donc possible que la protéine participe à la production des cytokines inflammatoires. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons procédé en deux temps. Nous avons d'abord analysé la cinétique d'apparition de *S100B* dans les BALFs et le sérum de souris B6 stimulées au LPS, puis nous avons étudié la réponse inflammatoire chez les lignées *S100B*^{+/-} et *S100B*^{-/-}.

Dans un premier temps, la cinétique d'apparition de *S100B*, dans le sérum et les BALFs de souris B6 a permis d'étudier le comportement de la protéine lors de l'inflammation. L'apparition de *S100B*, à la fois dans le sérum et les BALFs, après stimulation des souris par le LPS, suggère que *S100B* participerait à la signalisation de l'inflammation pulmonaire, ce qui est en accord avec les travaux d'Omori *et al.* (2008).

Afin de déterminer l'implication de *S100B* dans la réponse au LPS, nous avons mesuré la concentration des cytokines inflammatoires IL-6 et TNF- α , dans le sérum et les BALFs de souris *S100B*^{+/-} et *S100B*^{-/-}, ainsi que le recrutement des neutrophiles et l'activité myéloperoxydase. Il s'est avéré que la réponse inflammatoire des souris *S100B*^{+/-} et *S100B*^{-/-} ne diffère pas de celle observée chez les souris B6 contrôles. Par ailleurs, l'étude de l'expression de *S100B*, montre que le gène est bien exprimé dans les poumons, mais pas dans les macrophages. L'ensemble de ces résultats suggère que la perte *S100B* n'interfère pas avec la réponse inflammatoire.

Les travaux de Valencia *et al.* (2004a) prouvent que la liaison des AGEs à RAGE n'est pas suffisante pour induire la production de TNF- α , sauf dans le cas de *S100B*. Afin de comprendre comment agit *S100B*, ces mêmes auteurs ont stimulé des cellules endothéliales vasculaires humaines avec du LPS, *S100B* ou une préparation d'AGE-BSA, puis étudient les profils d'expression des gènes modifiés par ces stimulants. Ils confirment ainsi que le modèle d'AGEs contribue modestement à la réponse inflammatoire. Cependant, la stimulation par *S100B* entraîne l'activation des cellules endothéliales, tout comme le LPS. La stimulation par *S100B* induit la surexpression de 44 gènes et une diminution de l'expression de 10 gènes. Parmi les gènes surexprimés, on retrouve des gènes codant des cytokines, des molécules d'adhésion ainsi que des gènes impliqués dans la présentation des antigènes. Ce résultat confirme l'implication de *S100B* dans la mise en place de l'inflammation via l'activation de NF- κ B montré par Hoffman *et al.* en 1999. Le LPS entraîne la surexpression de 165 gènes et une diminution de l'expression de 11 gènes. Le traitement avec *S100B* induit la surexpression de gènes majoritairement différents de ceux surexprimés en réponse au LPS, suggérant ainsi que l'activation de NF- κ B par le LPS et *S100B* nécessite deux voies de signalisation différentes (*Figure 51*) (Valencia *et al.* 2004). Cela explique donc que même si *S100B* participe à l'inflammation, nous n'ayons pas trouvé de modification dans la réponse inflammatoire induite par le LPS entre les souris B6, *S100B*^{+/-} et *S100B*^{-/-}. En effet, dans notre cas, l'expression d'IL-6 et de TNF- α est due à l'activation de la voie NF- κ B. Si *S100B* activait NF- κ B par la même signalisation que le LPS, nous aurions dû voir un effet de l'absence de *S100B* chez les souris *S100B*^{+/-} et *S100B*^{-/-}. Chez les mutants *Prmt2*^{+/-}, le niveau d'activation du TNF- α est différent par rapport aux mutants *Ms1Yah*. Cela est certainement dû au croisement de deux voies de signalisation : la voie LPS-TLR4-NF- κ B-*Prmt2*, et la voie *S100B*-RAGE-NF- κ B. Peut être faut-il que la voie *Prmt2* soit en défaut pour voir l'effet de *S100B* sur la production de TNF- α . Ces données confirment les travaux de Valencia *et al.*

(2004) prouvant que les signalisations induites par le LPS et S100B empruntent deux voies différentes.

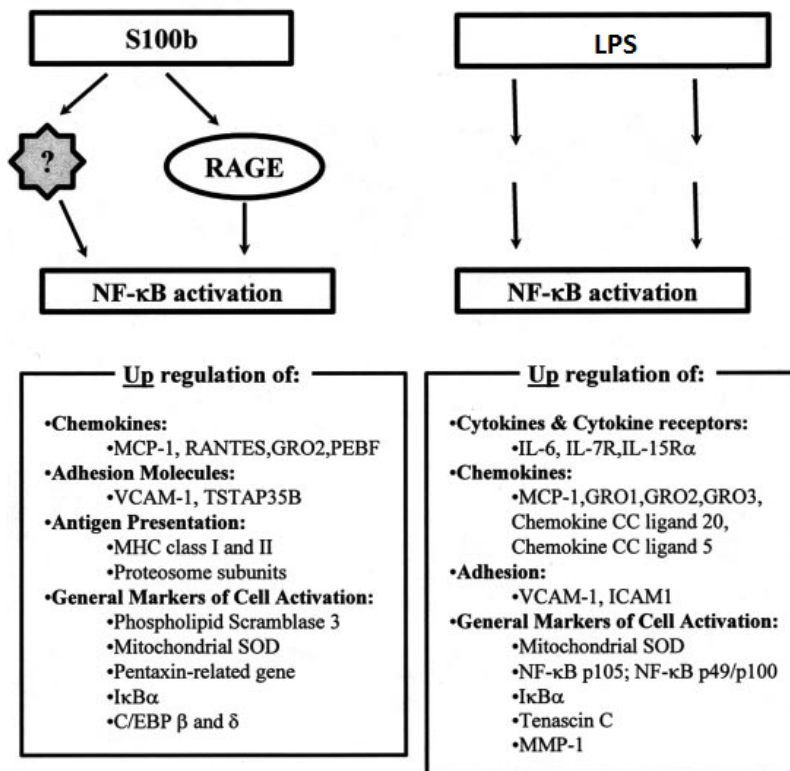


Figure 51: Résumé des gènes dont l'expression est modifiée, dans les cultures de cellules endothéliales, stimulées par S100B ou le LPS. Adaptée de Valencia et al. 2004.

II. Etude de la fonction pulmonaire

1. La pléthysmographie non invasive

Afin de déterminer le rôle de *Prmt2* et de *S100B* dans le phénotype de diminution de l'HRA observé chez les *Ms1Yah*, j'ai mesuré ce paramètre chez les souris *Prmt2*^{+/-}, *S100B*^{+/-} et *S100B*^{-/-} instillées avec le LPS. Pour cela, j'ai utilisé la technique de pléthysmographie non invasive.

Dans mes expériences, le PenH reflète de façon caractéristique l'état de la fonction pulmonaire. Bien que les protocoles de mesure de ce paramètre ne soient pas standardisés entre tous les laboratoires, il est acquis que des valeurs de PenH supérieures à 2,5 reflètent une constriction des muscles lisses des voies aériennes.

Cette mesure est bien souvent discutée car il semblerait qu'elle ne reflète pas uniquement l'état physiologique des voies aériennes profondes, mais également celui des

voies supérieures. C'est pourquoi suivant l'opinion scientifique il est conseillé de valider les mesures obtenues par pléthysmographie invasive. Dans ce cas, la souris est placée sous assistance respiratoire et le LPS est acheminé directement par nébulisation au niveau des alvéoles pulmonaires. Cependant, ce type d'expérimentation est uniquement possible si la réponse que l'on veut observer est rapide, de l'ordre de la dizaine de minute, tel le modèle ovalbumine/métacholine qui mime la crise d'asthme. Concernant mes travaux, il n'était pas envisageable de recourir à cette méthode invasive puisque la réponse induite par le LPS débute entre 60 et 90min après la stimulation. La méthode non invasive était donc la plus appropriée dans mon étude.

2. [*Prmt2* et l'hyper-réponse des voies aériennes](#)

Contrairement à ce qui est observé chez les Ms1Yah, la mesure de l'HRA chez les souris *Prmt2*^{+/-} montre que ces souris ont une susceptibilité accrue à la stimulation LPS. Le même phénomène a été observé chez les souris *Prmt2*^{-/-}. Ces résultats suggèrent que *Prmt2* jouerait un rôle dans l'HRA, mais qu'au moins un autre gène de la région *Prmt2-Col6a1* intervient pour expliquer la diminution de l'HRA observée chez les souris Ms1Yah.

Très récemment, une équipe chinoise a étudié l'expression des gènes *Prmt1* à 6 dans les poumons et les rates dans un modèle d'asthme chez le rat. Cette étude révèle que les gènes *Prmt1*, *Prmt2*, *Prmt3* et *Prmt5* sont surexprimés dans les poumons, et *Prmt2* et 5 sont surexprimés dans les rates. Ces travaux suggèrent que les gènes de la famille PRMTs jouent un rôle important dans les mécanismes de transcription des gènes impliqués dans l'asthme (Sun *et al.* 2010).

Les résultats que nous avons obtenus confirment d'une part que *Prmt2* intervient donc à la fois dans la réponse immunitaire d'autre part, en accord avec les travaux de Sun *et al.* (2010) suggèrent une implication de *Prmt2* et dans la constriction des bronches, en réponse au LPS.

3. *S100B* et l'hyper-réponse des voies aériennes

La mesure de l'HRA, induite par le LPS chez les souris *S100B*^{+/-}, montre une tendance à la diminution de l'HRA de ces souris par rapport aux souris B6. Toutefois, le résultat n'étant pas significatif, il ne permet pas de conclure clairement quant au rôle de *S100B* dans l'HRA.

Afin de vérifier si l'effet peut dépendre du nombre de copies de *S100B*, la même mesure a été réalisée chez les souris *S100B*^{-/-}. Les valeurs du PenH des souris *S100B*^{-/-} sont significativement moins élevées et montrent ainsi que *S100B* participe à l'HRA induite par le LPS, de façon dose dépendante.

Si on prend en compte l'ensemble de ces résultats, je confirme ici d'une part que *Prmt2* est un inhibiteur de la signalisation NF-κB., et d'autre part que *Prmt2* intervient indirectement dans la réponse inflammatoire, en favorisant la production des cytokines pro-inflammatoires.

Par ailleurs, *S100B* bien que participant à l'activation de NF-κB, via RAGE, n'intervient pas dans la réponse inflammatoire en réponse au LPS mais joue un rôle dans la fonction pulmonaire, au niveau de l'HRA.

L'hyper-réponse des voies aériennes, observée en réponse au LPS, est due à la contraction des cellules du muscle lisse des bronches. L'évènement déclenchant la contraction musculaire est l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. A la jonction neuro musculaire, le calcium est nécessaire à la fois pour la libération de l'acétylcholine dans la fente synaptique, et pour la propagation du potentiel d'action musculaire qui nécessite l'ouverture des canaux sodiques et calciques voltages dépendants. *S100B* étant une protéine de liaison au calcium, elle pourrait intervenir dans la transmission du potentiel d'action à la jonction neuro-musculaire.

Pour essayer de mieux comprendre le rôle de *S100B*, en collaboration avec le service d'histopathologie de l'ICS (Strasbourg), nous avons réalisé des coupes de poumons pour localiser la protéine. Ces expériences préliminaires montrent que *S100B* n'est pas présent dans les cellules du muscle lisse, mais plutôt dans les nerfs, ce qui serait en accord avec les résultats de Morbini *et al.* (2006) obtenus chez l'homme.

Le fait que *S100B* puisse être localisé dans les nerfs expliquerait qu'il interviendrait dans la contraction pulmonaire. En effet, l'innervation pulmonaire fait essentiellement intervenir le nerf vague, via des fibres provenant des pneumogastriques droit et gauche. Ses effets principaux au niveau du poumon sont une diminution du calibre des bronches ainsi qu'un renforcement de la contraction des cellules du muscle lisse (Coujard *et al.* 1980). Ainsi,

S100B pourrait réguler la disponibilité en calcium au niveau de la jonction neuromusculaire et donc intervenir dans la contraction musculaire.

III. Interaction entre *Prmt2* et *S100B*

L'étude de la réponse inflammatoire chez les souris *Prmt2*^{+/-} *S100B*^{+/-} et *S100B*^{-/-} a permis de confirmer que *Prmt2* régule la transcription des gènes de l'inflammation en réponse au LPS, mais pas *S100B*. La mesure de l'HRA chez ces trois lignées suggère que les deux gènes interviendraient dans ce phénotype. Cependant, l'HRA en réponse au LPS, est augmentée chez les souris *Prmt2*^{+/-} et diminuée chez les souris *S100B*^{-/-}. Ce qui laisse supposer que les deux gènes ont des rôles opposés dans l'HRA, *Prmt2* inhiberait l'HRA alors que *S100B* la favoriserait.

Par ailleurs, les études d'expression par Q-PCR ont montré que l'expression de *Prmt2* est dose dépendante dans les poumons à la fois chez les souris Ms1Yah et *Prmt2*^{+/-}, et que le gène est aussi exprimé dans les macrophages. *S100B*, est quant à lui exprimé dans les poumons, mais par un type cellulaire autre que les macrophages. Dans les poumons, le LPS induit une diminution de moitié de l'expression de *S100B* chez les souris Ms1Yah, alors qu'elle augmente chez les souris *Prmt2*^{+/-} (Figure 52). Ce résultat laisse supposer que *Prmt2* inhiberait *S100B*. Cette hypothèse est en accord avec le fait que chez les souris *Prmt2*^{+/-}, qui n'ont plus qu'une copie de *Prmt2*, l'action inhibitrice sur *S100B* soit levée et favorise l'HRA.

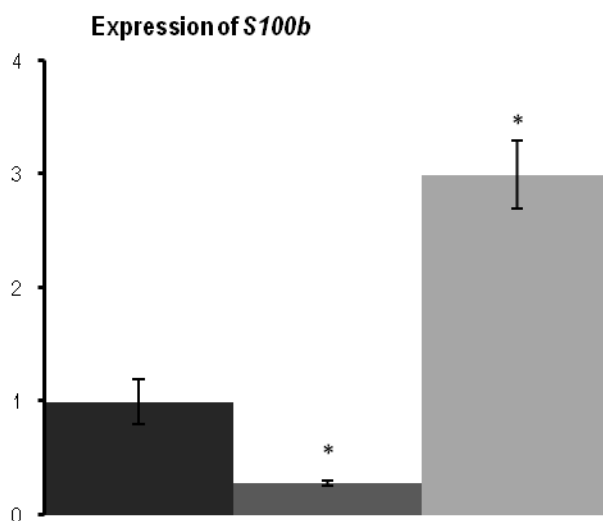


Figure 52: Expression du gène *S100B* dans les poumons des souris B6 (noir) Ms1Yah (gris) et *Prmt2*^{+/-} (gris clair) après stimulation LPS. L'expression de *S100B* est diminuée de moitié dans les poumons Ms1Yah, alors qu'elle augmente dans les poumons *Prmt2*^{+/-}.

IV. Utilisation de l'anticorps anti-S100B et perspectives thérapeutiques

1. Validation de l'inhibition de l'activité de S100B par l'anti-S100B

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier que l'inhibition de S100B, chez des souris sauvages récapitule le phénotype observé chez les souris *S100B^{-/-}*.

En 2004, Bozinovski *et al.* utilisent des anticorps bloquant S100A8 et S100A9, et montrent ainsi que S100A8 participe partiellement au recrutement des neutrophiles en réponse au LPS, mais pas S100A9. L'utilisation de l'anticorps anti-S100A8 ayant été efficace pour bloquer l'activité de la protéine, j'ai donc choisi d'utiliser un anticorps anti-S100B afin d'inhiber l'action de S100B. L'anticorps utilisé est un polyclonal il reconnaît de nombreux épitopes et les chances de neutraliser la fonction de l'antigène sont ainsi augmentées. En effet, on crée probablement de plus gros complexes immuns dont l'épuration est facilitée. L'inconvénient de l'anticorps polyclonal est justement qu'il reconnaît de multiples épitopes et nécessite donc que l'on utilise des grandes quantités d'anticorps. C'est pour cela, que même si à partir de 1 mg d'anti-S100B, l'HRA est diminuée, j'ai préféré utiliser 2mg afin de me placer dans des conditions optimales d'action de l'anticorps.

Il s'est avéré que l'anticorps anti-S100B est efficace pour réduire l'HRA induite par le LPS, sans pour autant modifier la réponse inflammatoire des souris B6. La même expérience réalisée sur les souris *Prmt2^{+/-}* dont l'HRA est plus importante a permis de valider l'action de l'anticorps. L'injection de l'anticorps chez ces souris, conduit à une diminution significative des valeurs du PenH, sans pour autant modifier la réponse inflammatoire qui reste plus élevée que chez les contrôles.

2. Utilisation de l'anti-S100B dans un modèle d'asthme

Le fait que l'inactivation du gène *S100B* conduit à une diminution de l'HRA sans altérer la réponse inflammatoire, est intéressant d'un point de vue thérapeutique. En effet, si l'on prend comme exemple le cas de l'asthme allergique, l'aspect le plus handicapant lors de la crise d'asthme est la difficulté à respirer du patient, qui résulte d'une part la diminution du calibre des bronches suite à leur contraction et d'autre part de la production de mucus. Il est donc intéressant, dans ce cas, de faciliter la bronchodilatation sans modifier la réponse

inflammatoire. C'est principalement dans ce but que nous testons actuellement l'action de l'anti-S100B dans le modèle murin d'asthme. Les résultats préliminaires montrent une que sur un groupe de 5 souris, plus la dose de métacholine est importante, plus l'anticorps semble efficace. Bien que les résultats soient prometteurs, il est certain que les effectifs sont encore trop réduits pour conclure sur un effet significatif. Ces résultats préliminaires, laissent entrevoir le potentiel thérapeutique d'une telle molécule. En effet, l'anti-S100B pourrait être utilisé comme bronchodilatateur dans les maladies induisant une contraction active des cellules musculaires lisses, telles que l'asthme allergique ou la broncho-pneumopathie chronique obstructive. Aujourd'hui, le traitement principal de la crise d'asthme consiste en une inhalation d'une dose de 100µg de salbutamol qui provoque un relâchement de la musculature bronchique via son action agoniste sur les récepteurs adrénergiques bêta 2. En effet, ces récepteurs sont localisés au niveau des fibres musculaires lisses, leur stimulation entraînant une relaxation musculaire. Néanmoins, l'action du salbutamol, bien qu'étant rapide (5 à 10 min après inhalation) reste de courte durée.

Dans le modèle LPS, les souris (B6 et *Prmt2*^{+/-}) ayant reçu l'anticorps présentent des valeurs de PenH relativement faibles, et ceci durant toute la durée de l'acquisition. Les souris stimulées au LPS (B6 et *Prmt2*^{+/-}) présentent une élévation du PenH entre 60 et 90min, puis après avoir atteint un pic, ces valeurs retrouvent un niveau basal identique aux souris ayant reçu l'anticorps, 180min après la stimulation. Cette observation montre que l'effet de l'anticorps anti-S100B est d'au moins 3h dans le modèle LPS. Il faudra bien sûr vérifier la durée de l'action de l'anticorps dans le modèle d'asthme. Ce qui n'est pas étonnant puisque la demi-vie, dans le sérum, des anticorps utilisés en thérapie pour les maladies auto-immunes varie entre 8 jours et 8 semaines (Chan et Carter, 2010).

V. Inflammation pulmonaire et Trisomie 21

Je finirai en remplaçant ces résultats dans le contexte initial de cette thèse. En plus de nombreux signes cliniques dont le phénotype est variable d'un individu à l'autre, les patients trisomique 21 présentent une susceptibilité accrue à certaines pathologies. L'hypersensibilité aux infections pulmonaires en fait la seconde cause de décès chez les patients T21. Afin de décrypter les mécanismes mis en jeu dans les phénotypes observés chez les patients, nous sommes attachés à créer des modèles murins de trisomie et monosomie pour les gènes

homologues au HSA21. Ces modèles vont permettre d'identifier des gènes dont la variation du nombre de copies fait apparaître les phénotypes observés chez l'homme. Nous avons ainsi développé un modèle murin de monosomie pour la région *Prmt2-Col6a1* qui présente une augmentation de la réponse inflammatoire, mais une atteinte réduite de la fonction pulmonaire, après un challenge au LPS. Mes travaux de thèse ont permis d'associer deux gènes aux phénotypes observés. Pour la première fois, les fonctions des gènes *Prmt2* et *S100B* sont associées de façon claire, à des phénotypes de la Trisomie 21. De plus, une nouvelle fonction du gène *S100B* est décrite : son implication dans la constriction des bronches induite par le LPS.

Perspectives

Nous avons montré que S100B n'est pas impliqué dans la réponse inflammatoire induite par le LPS. Plusieurs équipes ont déjà montré que S100B joue un rôle dans la production de TNF- α lors de l'inflammation, via l'activation de RAGE (Valencia *et al.* 2004a ; Yan *et al.* 1993 ; Hofmann *et al.* 1999). En accord avec les résultats de Valencia *et al.* (2004), nous confirmons que l'activation de NF- κ B par le LPS passe par une autre voie que celle faisant intervenir S100B/RAGE. Afin d'étudier plus précisément l'implication de S100B dans l'activation de NF- κ B, nous pourrions traiter les souris *S100B*^{+/-} et *S100B*^{-/-} avec une injection de S100B et mesurer les concentrations en IL-6 et TNF- α ainsi produites.

Par ailleurs, il serait intéressant de décrypter le mécanisme d'action de S100B lors de l'HRA. Le marquage des coupes de poumons a révélé une augmentation du nombre de cellules marquées avec l'anti-S100B, après stimulation des souris au LPS. il serait intéressant d'identifier le(s) type(s) cellulaires marqués. Le LPS entraînant un recrutement des neutrophiles au site de l'inflammation, les cellules marquées sont certainement un mélange de macrophages activés et de neutrophiles. Nous avons commandé un anti-CD14 pour marquer les macrophages ainsi qu'un anti-CD11 pour les neutrophiles.

De plus, S100B étant un ligand du récepteur RAGE, nous sommes en train de nous procurer des souris KO pour RAGE afin de vérifier si ces souris récapitulent ou non les phénotypes observés chez les souris *S100B*^{-/-}.

Concernant l'efficacité de l'anticorps anti-S100B dans le modèle d'asthme, une nouvelle série de sensibilisation et de mesure de l'HRA est actuellement en cours afin de porter les effectifs à n=12. De plus, il sera bien entendu nécessaire de vérifier que l'anti-S100B ne modifie pas la réponse inflammatoire, et ceci en mesurant les cytokines IL-4 et 5, ainsi que le recrutement des éosinophiles. En effet, dans le cas de l'asthme allergique, ce sont ces médiateurs qui jouent un rôle majeur dans la mise en place de la réaction inflammatoire bronchopulmonaire allergique. Ensuite, nous voudrions réaliser une cinétique, afin d'examiner la production de S100B dans le sérum et les BALFs des souris, après chaque sensibilisation, et à différents temps lors des challenges aux jours 18, 19 et 20. En effet, pour le moment, la seule mesure que nous ayons réalisée après le dernier challenge a montré la présence de S100B uniquement dans le sérum, alors que l'inflammation pulmonaire a été mise en évidence par une augmentation du nombre de cellules total ainsi que du nombre d'éosinophiles recrutés dans les BALFs. L'effet de l'anti-S100B dans le modèle d'asthme se

ensuite validé par une analyse en pléthysmographie invasive, ce qui permettra d'évaluer l'action de l'anticorps sur les voies respiratoires inférieures.

Enfin, dans le but de développer une potentielle application thérapeutique de l'anti-S100B, il faudrait commencer par vérifier la présence de S100B dans le sérum humain. Si la présence de S100B dans le sérum des souris du modèle d'asthme est confirmée, je pense que nous pourrions mesurer la concentration de S100B dans le sérum à partir de patients présentant un asthme allergique.

Bibliographie

- Adams DJ, Biggs PJ, Cox T, Davies R, van der Weyden L, *et al.* (2004) Mutagenic Insertion and Chromosome Engineering Resource (MICER). *Nat Genet* **36(8)**: 867-871.
- Ahn K.J., Jeong H.K., Choi H.S., Ryoo S.R., Kim Y.J., Goo J.S., Choi S.Y., Han J.S., Ha I. et Song W.J. (2006) DYRK1A BAC transgenic mice show altered synaptic plasticity with learning and memory defects. *Neurobiology of Disease*, **22(3)**:463-472.
- Aït Yahya-Graison, Aubert J, Dauphinot L, Rivals I, Prieur M et al (2007) Classification of human chromosome 21 gene-expression variations in Down syndrome: impact on disease phenotypes. *Am. J. Hum. Genet.* **81**: 475-491.
- Akira S, Takeda K et Kaisho T (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquire immunity. *Nat Immunol* **2(8)**: 675-680.
- Alderton LE, Spector LG, Blair CK, Roesler M, Olshan AF, *et al.* (2006) Child and maternal household chemical exposure and the risk of acute leukemia in children with Down's syndrome: a report from the children's oncology group. *American Journal of Epidemiology*, **164(3)**:212-221.
- Alkhalaf M, Verghese L, Muharib N (2002) A cytogenetic study of Kuwaiti couples with infertility and reproductive disorders: short arm deletion of chromosome 21 is associated with male infertility. *Ann Genet* **45(3)**: 147-9.
- Altafaj X., Dierssen M., Baamonde C., Martí E., Visa J., Guimerà J., Oset M., González J.R., Flórez J., Fillat C. et Estivill X. (2001) Neurodevelopmental delay, motor abnormalities and cognitive deficits in transgenic mice overexpressing *Dyrk1A* (*minibrain*), a murine model of Down's syndrome. *Human Molecular Genetics*; 10(18):1915-1923.
- Andenogui G, Bonder CS, Green F, Mullaly SC, Zbytnuik L *et al.* (2003) Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. *J Clin Invest* **111(7)**: 1011-11020.
- Annerén K.G., Korenberg J.R. et Epstein C.J. (1987) Phosphofructokinase activity in fibroblasts aneuploid for chromosome 21. *Human Genetics*, 76(1):63-65.

- Antonarakis SE (1991) Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms. Down Syndrome Collaborative Group. *N Engl J Med.* **324(13)**: 872-6.
- Antonarakis SE (2001) Chromosome 21: from sequence to applications. *Curr Opin Genet Dev* **11(3)**: 241-246.
- Antonarakis SE, Lyle R, Deutsch S, Reymond A (2002) Chromosome 21: a small land of fascinating disorders with unknown pathophysiology. *Int J Dev Biol* **46(1)**: 89-96.
- Antonarakis SE, Lyle R, Dermitzakis ET, Reymond A, Deutsch S (2004) Chromosome 21 and Down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet* **5(10)**: 725-738.
- Aoki K, Ishida Y, Kikuta N, Kawai H, Kuroiwa M *et al.* (2002) Role of CXC chemokines in the enhancement of LPS-induced neutrophil accumulation in the lung of mice by dexamthasone. *Biochem Biophys Res Commun* **294(5)**: 1101-1108.
- Aylward EH, Li Q, Honeycutt NA, Warren AC, Pulsifer MB (1999) MRI volumes of the hippocampus and amygdala in adults with Down's syndrome with and without dementia. *Am J Psychiatry* **156(4)**: 564-8.
- Badner JA, Sieber WK, Garver KL et Chakravarti A (1990) A genetic study of Hirschsprung disease. *American Journal of Human Genetics*, 46(3):568-580.
- Balarajan R, Donnan SPB et Adelstein AM (1982) Mortality and cause of death in Down's syndrome. *Journal of Epidemiology and Community Health*, **36** : 127-129
- Barth E, Bouvaist H, Marlière S, Gérard Ninet G et Vanzetto G (2009) Pulmonary stenosis development and reduction of pulmonary arterial hypertension in atrioventricular septal defect: a case report. *Journal of Cardiothoracic Surgery*, **4**:49.
- Barlow GM, Chen XN, Shi ZY, Lyons GE, Kurnit DM (2001) Down syndrome congenital heart disease: a narrowed region and a candidate gene. *Genet Med.* **3(2)**: 91-101.

- Nadia P. Belichenko, Pavel V. Belichenko, Alexander M. Kleschevnikov, Ahmad Salehi, Roger H. Reeves, and William C. Mobley (2009) The “Down Syndrome Critical Region” Is Sufficient in the Mouse Model to Confer Behavioral, Neurophysiological, and Synaptic Phenotypes Characteristic of Down Syndrome. *The Journal of Neuroscience*, **29(18)**:5938 –5948.
- Bell AJ, Bhate MS (1992) Prevalence of overweight and obesity in Down's syndrome and other mentally handicapped adults living in the community. *J Intellect Disabil Res.* **36 (Pt 4)**: 359-64.
- Blennow K., de Leon M.J. et Zetterberg H. (2006) Alzheimer's disease. *The Lancet*, 368(9533):387-403.
- Besson V, Brault V, Duchon A, Togbe D, Bizot JC *et al.* (2007) Modeling the monosomy for the telomeric part of human chromosome 21 reveals haploinsufficient genes modulating the inflammatory and airway responses. *Hum Mol Genet* **16(17)**: 2040-2052.
- Biberthaler P, Linsenmeier U, Pfeifer KJ, Kroetz M, Mussack T *et al.* (2006) Serum S-100B concentration provides additional information for the indication of computed tomography in patients after minor head injury: a prospective multicenter study. *Shock* **25(5)**: 446-453.
- Bloemers B, Van Furth M, Weijerman M, Gemke R, Broers C *et al.* (2007) Down Syndrome: A Novel Risk Factor for Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis— A Prospective Birth-Cohort Study *Pediatrics* **120**: 1076-1081.
- Bozinovski S, Cross M, Vlahos, Jones JE, Hsueh K *et al.* (2005) S100A8 chemotactic protein is abundantly increased, but only a minor contributor to LPS-induced, steroid resistant neutrophilic lung inflammation in vivo. *J Proteome Res* **4(1)**: 136-145.
- Brault V, Pereira P, Duchon A et Herault Y (2006) Modeling chromosomes in mouse to explore the function of genes, genomic disorders, and chromosomal organization. *Plos Genet* **2**:e86.
- Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E *et al.* (1993) Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced Glycation end products in tissues. *Am J Pathol* **143(6)**: 1699-1712.
- Cant AJ, Gibson PJ et West RJ (1987) Bacterial tracheitis in Down's syndrome. *Archives of Disease in Childhood*, **62**: 962-963.

- Carty M, Goobody R, Schröder M, Stack J, Moynagh PN *et al.* (2006) The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol* **7(10)** : 1074-1081.
- Chan AC et Carter PJ (2010) Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* **10(5)**: 301-316.
- Chavakis T, Bierhaus A et Nawroth P (2004) RAGE (Receptor for advanced glycation end products): a central player in the inflammatory response. *Microbes and Infections* **6**: 1219-1225.
- Cheng C, Tsuneyama K, Kominami R, Shinohara S, Yonekura H *et al.* (2005) Expression profiling of endogenous secretory receptor for advanced glycation en products in human organs. *Mod Pathol* **18(10)**: 1385-1396.
- Chettouh Z, Croquette MF, Delobel B, Gilgenkrants S, Leonard C *et al.* (1995) Molecular mapping of 21 features associated with partial monosomy 21: involvement of the APP-SOD1 region. *Am J Hum Genet* **57(1)**: 62-71.
- Cossarizza A, Ortolani C, Forti E, Montagnani G, Paganelli R *et al.* (1991) Age-Related Expansion of Functionally Inefficient Cells With Markers of Natural Killer Activity in Down's Syndrome. *Blood* **77(6)** : 1263-1270.
- Cox D.R., Smith S.A., Epstein L.B. et Epstein C.J. (1984) Mouse trisomy 16 as an animal model of human trisomy 21 (Down syndrome): production of viable trisomy 16 diploid mouse chimeras. *Developmental Biology*, 101(2):416-424.
- Costa AC, Grybko MJ (2005) Deficits in hippocampal CA1 LTP induced by TBS but not HFS in the Ts65Dn mouse: a model of Down syndrome. *Neurosci Lett* **382(3)**: 317-22.
- Cuckle HS, Wald NJ, Thompson SG (1987) Estimating a woman's risk of having a pregnancy associated with Down's syndrome using her age and serum alpha-fetoprotein level. *Br J Obstet Gynaecol* **94**: 387-402.
- Dahlin K, Mager EM, Allen L, Tigue Z, Goodglick L *et al.* (2004) Identification of genes differentially expressed in rat alveolar type I cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **31(3)**: 309-316.

- Davisson MT, Schmidt C, Reeves RH, Irving NG, Akeson EC *et al.* (1993) Segmental trisomy as a mouse model for Down syndrome. *Prog Clin Biol Res.* **384**: 117-33.
- Dauphinot L, Lyle R, Rivals I, Dang MT, Moldrich RX *et al.* (2005) The cerebellar transcriptome during postnatal development of the Ts1Cje mouse, a segmental trisomy model for Down syndrome. *Hum Mol Genet* **14**(3): 373-384.
- Delabar JM, Theophile D, Rahmani Z, Chettouh Z, Blouin JL *et al.* (1993) Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur J Hum Genet.* **1**(2): 114-24.
- Dermitzakis ET, Reymond A, Antonarakis SE (2005) Conserved non-genic sequences - an unexpected feature of mammalian genomes. *Nat Rev Genet* **6**(2): 151-7.
- Dierssen M, Fillat C, Crnic L, Arbonés M, Flórez J, Estivill X (2001) Murine models for Down syndrome. *Physiol Behav* **73**(5): 859-71.
- Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R *et al.* (2009) S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochimica et Biophysica Acta* **1793**: 1008-1022.
- Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, García F, Veiga A *et al.* (2000). Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* **6**(1): 93-105.
- Epstein CJ, Avraham KB, Lovett M, Smith S, Elroy-Stein O *et al.* (1987) Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity: animal model of dosage effects in Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **84**(22): 8044-8.
- Epstein CJ (1990) The consequences of chromosome imbalance. *Am J Med Genet Suppl.* **7**: 31-7
- Falik-Borenstein TC, Pribyl TM, Pulst SM, Van Dyke DL, Weiss L *et al.* (1992) Stable ring chromosome 21: molecular and clinical definition of the lesion. *Am J Med Genet.* **42**(1): 22-8.
- Fenton MJ et Golenbock DT (1998) LPS-binding proteins and receptors. *J Leuk Biol* **64**(1): 25-32.

- Fernandez-Fernandez MR, Veprintsev DB et Fersht AR (2005) Proteins of the S100 family regulate the oligomerization of p53 tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 4735-4740.
- Fey G, Hocke G, Wilson D, Ripperger J, Juan T *et al.* (1994) Cytokines and the acute phase response of the liver. *The liver: biology and pathology*, 3rd edition 113-142.
- Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A *et al.* (2003) LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF- κ B involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* **198**(7) : 1043-1055.
- FitzPatrick DR, Ramsay J, McGill NI, Shade M, Carothers AD, Hastie ND (2002) Transcriptome analysis of human autosomal trisomy. *Hum Mol Genet.* **11**(26): 3249-56.
- Fleige S et Pfaffl MW (2006) RNA integrity and the effects on the real time qRT-PCR performance. *Molecular aspects of medicine* **27**: 126-139.
- Fotaki V., Dierssen M., Alcantara S., Martínez S., Martí E., Casas C., Visa J., Soriano E., Estivill X. et Arbones M.L. (2002) *Dyrk1A* haploinsufficiency affects viability and causes developmental delay and abnormal brain morphology in mice. *Molecular and Cellular Biology*, **22**(18):6636–6647
- Franciotta D, Verri A, Zardini E, Andreoni L, De Amici M *et al.* (2006) Interferon- γ - and interleukin-4-producing T cells in Down's syndrome. *Neuroscience Letters* **395** : 67–70.
- Frederikse PH, Ren XO (2002). Lens defects and age-related fiber cell degeneration in a mouse model of increased AbetaPP gene dosage in Down syndrome. *Am J Pathol.* **161**(6): 1985-90.
- Freed KS, Kliewer MA, Hertzberg BS, DeLong DM, Paulson EK, Nelson RC (2000) Pelvic CT morphometry in Down syndrome: implications for prenatal US evaluation-preliminary results. *Radiology.* **214**(1): 205-8.
- Fujimura S, Xing Y, Takeya M, Yamashita Y, Ohshima K *et al.* (2005) Increased expression of germinal center-associated nuclear protein RNA-primase is associated with lymphomagenesis. *Cancer Res* **65**: 5925-5934.

- Ganesh L, Yoshimoto T, Moorthy NC, Akahata W, Boehm M *et al.* (2006) Protein methyltransferase 2 inhibits NF- κ B function and promotes apoptosis. *Mol and Cell Biol* **26**(10): 3864-3874.
- Gardiner K, Fortna A, Betchel L *et* Davisson MT (2003) Mouse models of Down syndrome: how useful can they be? Comparison of the gene content of human chromosome 21 with orthologous mouse genomic regions. *Gene* **318**: 137-147.
- Gerlach R, Demel G, König HG *et al.* (2006) Active secretion of S100B from astrocytes during metabolic stress. *Neurosciences* **141**: 1697-1701.
- Ghavami S, Rashedi I, Dattilo B, Eshraghi M, Chazin W *et al.* (2008). S100A8/A9 at low concentration promotes tumor cell growth via RAGE ligation and MAP kinase-dependent pathway. *Journal of leukocyte biology* **83**:1484-1492.
- Gökçora N, Atasever T, Karabacak NI, Vural G, Gücüyener K (1999) Tc-99m HMPAO brain perfusion imaging in young Down's syndrome patients. *Brain Dev.* **21**(2): 107-12.
- Guimerá J., Casas C., Pucharcòs C., Solans A., Domènech A., Planas A.M., Ashley J., Lovett M., Estivill X. *et* Pritchard M.A. (1996) A human homologue of *Drosophila* minibrain (MNB) is expressed in the neuronal regions affected in Down syndrome and maps to the critical region. *Human Molecular Genetics*, **5**(9):1305-1310.
- Guimera J, Casas C, Estivill X, Pritchard M (1999) Human minibrain homologue (MNBH/DYRK1): characterization, alternative splicing, differential tissue expression, and overexpression in Down syndrome. *Genomics* **57**(3): 407-18.
- Gurbuxani S, Vyas P, Crispino JD (2004) Recent insights into the mechanisms of myeloid leukemogenesis in Down syndrome. *Blood*.**103**(2): 399-406.
- Hämmerle B., Carnicero A., Elizalde C., Céron J., Martinez S. *et* Tejedor F.J. (2003) Expression patterns and subcellular localization of the Down syndrome candidate protein MNB/DYRK1A suggest a role in late neuronal differentiation. *European Journal of Neuroscience*, **17**:2277-2286.

- Hasle H, Clemmensen IH, Mikkelsen M (2000) Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet*. **355(9199)**: 165-9.
- Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T *et al.* (2000) The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* **405(6784)**: 311-9.
- Haydar TF, Blue ME, Molliver ME, Krueger BK, Yarowski PJ (1996). Consequences of trisomy 16 for mouse brain development: corticogenesis in a model of Down syndrome. *J Neurosci* **16**: 6175– 82.
- Hellemans J, Mortier G, De paepes A, Speleman F et Vandesompele J (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology* **8**:I2-R19.
- Hérault Y, Rassoulzadegan M, Cuzin F et Duboule D (1998) Engineering chromosomes in mice through targeted meiotic recombination (TAMERE) *Nat Genet* **20(4)**: 381-384.
- Higashino H, Niwa A, Satou T, Ohta Y, Hashimoto *et al.* (2009) Immunohistochemical analysis of brain lesions using S100B and glial acidic protein antibodies in arundic acid-(ONO-2506) treated stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Neural Transm* **116**: 1209-1219.
- Hitzler JK, Zipursky A (2005) Origins of leukaemia in children with Down syndrome. *Nat Rev Cancer*. **5(1)**: 11-20.
- Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A *et al.* (1999) RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* **97(7)**: 889-901.
- Holtzman DM, Santucci D, Kilbridge J, Chua-Couzens J, Fontana DJ *et al.* (1996) Developmental abnormalities and age-related neurodegeneration in a mouse model of Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93(23)**: 13333-8.
- Hook EB (1981) Rates of chromosome abnormalities at different maternal ages. *Obstet Gynecol* **58**: 282.

- Honrg T, Barton GM, Medzhitov R (2001) TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* **2(9)**: 835-841.
- Honrg T, Barton GM, Flavell RA et Medzhitov R (2002) The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* **20(6913)**: 329-333.
- Hsu CD, Kymes S, Petrash JM (2006) A transgenic mouse model for human autosomal dominant cataract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47(5)**: 2036-44.
- Hyde LA, Frisone DF, Crnic LS (2001). Ts65Dn mice, a model for Down syndrome, have deficits in context discrimination learning suggesting impaired hippocampal function. *Behav Brain Res.* **118(1)**: 53-60.
- Insausti AM, Megías M, Crespo D, Cruz-Orive LM, Dierssen M *et al.* (1998) Hippocampal volume and neuronal number in Ts65Dn mice: a murine model of down syndrome. *Neuroscience Letters* **253(3)**: 175-178.
- Iwasaki N, Cox NJ, Wang YQ, Schwarz PE, Bell GI *et al.* (2003) Mapping genes influencing type 2 diabetes risk and BMI in Japanese subjects. *Diabetes.* **52(1)**: 209-13.
- Joosten AM, De Vos S, Van Opstal D, Brandenburg H, Gaillard JL *et al.* (1997) Full monosomy 21, prenatally diagnosed by fluorescent in situ hybridization. *Prenat Diagn* **17(3)**: 271-5.
- Kahlem P, Sultan M, Herwig R, Steinfath M, Balzereit D *et al.* (2004). Transcript level alterations reflect gene dosage effects across multiple tissues in a mouse model of Down syndrome. *Genome Res.* **14(7)**: 1258-67.
- Kawahara Y, Ito K, Sun H, Kanazawa I, Kwak S (2003). Low editing efficiency of GluR2 mRNA is associated with a low relative abundance of ADAR2 mRNA in white matter of normal human brain. *Eur J Neurosci.* **18(1)**: 23-33.
- Kearney K. et Gentile A.M. (2003) Prehension in young children with Down syndrome. *Acta Psychologica*, **112(1)**:3-16.

- Korenberg JR, Chen XN, Schipper R, Sun Z, Gonsky R *et al.* (1994) Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **91(11)**: 4997-5001.
- Kuwahara K, Fujimura S, Takahashi Y, Nakagata N, Takemori T *et al.* (2004) Germinal center-associated nuclear protein contributes to affinity maturation of B cell antigen receptor in T cell-dependent responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:1010-1015.
- Laffaire J, Rivals I, Dauphinot L, Pasteau F, Wehrle R *et al.* (2009) Gene expression signature of cerebellar hypoplasia in a mouse model of Down syndrome during postnatal development. *BMC Genomics*. Mar 30;10:138.
- Lampe AK, Bushby KM (2005) Collagen VI related muscle disorders. *J Med Genet* **42(9)**: 673-685.
- Lejeune J, Gauthier M, Turpin R (1959) Etudes des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *CR Acad. Sci.* **248** : 1721–1722.
- Li Z, Yu T, Morishima M, Pao A, LaDuca J *et al.* (2007). Duplication of the entire 22.9 Mb human chromosome 21 syntenic region on mouse chromosome 16 causes cardiovascular and gastrointestinal abnormalities. *Hum Mol Genet.* **16(11)**: 1359-66.
- Liberati NT, Fitzgerald KA, Kim DH, Feinbaum R, Golenbock *et al.* (2004) Requirement for a conserved Toll/interleukin-1 resistance domain protein in the *Caenorhabditis elegans* immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* **101(17)**: 6593-6598.
- Lomas JL, Chung CS, Gurttoski PS, LeBlanc BW, Lavigne L *et al.* (2003) Differential effects of macrophages inflammatory chemokine-2 and keratinocyte-derived chemokine on hemorrhage-induced neutrophil priming for lung inflammation: assessment by adoptive cells transfer in mice. *Shock* **19(4)**: 358-365.
- Lorenzi HA, Reeves RH (2006) Hippocampal hypocellularity in the Ts65Dn mouse originates early in development. *Brain Res* **1104(1)**: 153-9.
- Lubec G., Labudova O., Cairns N. et Fountoulakis M. (1999) Increased glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase levels in the brain of patients with Down's syndrome. *Neurosciences Letters*, 260(2):141-145.

- Lucioli S, Giusti B, Mercuri E, Vanegas OC, Pietroni V *et al.* (2005) Detection of common and private mutations in the COL6A1 gene of patients with Bethlem myopathy. *Neurology* **64(11)** : 1931-1937.
- Lyle R, Gehrig C, Neergaard-Henrichsen C, Deutsh S et Antonarakis SE (2004) Gene expression from the aneuploid chromosome in a trisomy mouse model of Down syndrome. *Genome Res* **14**:1268-1274.
- Lyle R, Béna F, Gagos S, Gehrig C, Lopez G *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**:454-466.
- Mackay DS, Andley UP, Shiels A (2003) Cell death triggered by a novel mutation in the alphaA-crystallin gene underlies autosomal dominant cataract linked to chromosome 21q. *Eur J Hum Genet.* **11(10)**: 784-93.
- Marenholz I, Heizmann C et Fritz G (2004) S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biomech and Biophys Res Comm* **322**:1111-1122.
- Masters C.L., Simms G., Weinman N.A., Multhaup G., McDonald B.L. et Beyreuther K. (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**:4245-4249.
- Melville CA, Cooper SA, McGrother CW, Thorp CF, Collacott R (2005) Obesity in adults with Down syndrome: a case-control study. *J Intellect Disabil Res* **49(Pt 2)**: 125-133.
- Moore CS (2006) Postnatal lethality and cardiac anomalies in the Ts65Dn Down syndrome mouse model. *Mamm Genome.* **17(10)**: 1005-12.
- Morbini P, Villa C, Campo I, Zorzetto I, Inghilleri S *et al.* (2006) The receptor for advanced glycation end products and its ligand: a new inflammatory pathway in lung disease? *Modern pathology* **19**: 1437-1445.
- Mori M, Li G, Abe I, Nakayama J, Guo Z, Sawashita J *et al.* (2006) Lanosterol synthase mutation cause cholesterol deficiency-associated cataractq in the Shumiya cataract rat. *J Clin Invest* **116**: 395-404.

- Mori MA, Lapunzina P, Delicado A, Nunez G, Rodriguez JI *et al.* (2004) A prenatally diagnosed patient with full monosomy 21: ultrasound, cytogenetic, clinical, molecular, and necropsy findings. *Am J Med Genet A* **127**(1): 69-73.
- Mukhopahyay M, Pelka P, Desousa D, Kablar B, Schindler A *et al.* (2002) Cloning, genomic organization and expression pattern of a novel *Drosophila* gene, the disco-interacting protein 2 (dip2), and its murine homolog. *Gene* **293** (1-2): 59-65.
- Muller K, Townend W, Biasca N *et al.* (2007) S100B serum level predicts computed tomography findings after minor head injury. *J Trauma* **62**: 1452-1456.
- Murphy M., Insoft RM, Pike-Nobile L, Derbin KS et Epstein LB (1993) Overexpression of LFA-1 and ICAM-1 in Down Syndrome thymus. Implications for abnormal thymocyte maturation. *The Journal of Immunology*, **150**(12):5696-5703.
- Miyoshi K, Onishi K, Asanuma M, Miyazaki I, Diaz-Corrales FJ *et al.* (2006) Embryonic expression of pericentrin suggests universal roles in ciliogenesis. *Dev Genes Evol* **216**:537-542.
- Nishiyama H, Knöpfel T, Endo S, Itohara S (2002) Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *PNAS* **99**(6): 4037-4042.
- Nisihara R, Utiyama S, Oliveira N, Messias-Reason I (2010) Mannan-binding lectin deficiency increases the risk of recurrent infections in children with Down's syndrome. *Human Immunology* **71** : 63–66.
- Nguyen HP, Riess A, Krüger M, Bauer P, Singer S *et al.* (2009) Mosaic Trisomy 21 / Monosomy 21 in a Living Female Infant. *Cytogenet Genome Res* **125**:26–32.
- Noulin N, Quesniaux VF, Schnyder-Candrian S, Shnyder B, Maillet I *et al.* (2005) Both hemopoietic and resident cells are required for MyD88-dependent pulmonary inflammatory response to inhaled endotoxin. *J Immunol* **175**(10): 6861-6869.
- O'Doherty AM, Fisher EM (2003). Microcell-mediated chromosome transfer (MMCT): small cells with huge potential. *Mamm Genome*. **14**(9): 583-92.

- Olson TS et Ley K (2002) Chemokines and chemokine receptors in leukocytes trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **283(1)**: R7-28.
- Olson LE, Richtsmeier JT, Leszl J, Reeves RH (2004). A chromosome 21 critical region does not cause specific Down syndrome phenotypes. *Science*. **306(5696)**: 687-90.
- Olson LE, Roper RJ, Baxter LL, Carlson EJ, Epstein CJ, Reeves RH (2004a). Down syndrome mouse models Ts65Dn, Ts1Cje, and Ms1Cje/Ts65Dn exhibit variable severity of cerebellar phenotypes. *Dev Dyn*. **230(3)**: 581-9.
- Olson LE, Roper RJ, Sengstaken CL, Peterson EA, Aquino V, *et al.* (2007) Trisomy for the Down syndrome 'critical region' is necessary but not sufficient for brain phenotypes of trisomic mice. *Human Molecular Genetics*, **16(7)**:774–782.
- Omori K, Ohira T, Uchida Y, Ayilavaparu S, Batista EL *et al.* (2008) Priming of neutrophil oxidative burst in diabetes requires preassembly of the NADPH oxidase. *J Leukoc Biol* **84**:292-301.
- O'Neill LA et Bowie AG (2007) the family of five: TIR-domain-containing adaptators in Toll-like receptors signaling. *Nat Rev Immunol* **7(5)**: 353-364.
- Orti R, Mégarbane A, Maunoury C, Van Broeckhoven C, Sinet PM, Delabar JM (1997) High-Resolution Physical Mapping of a 6.7-Mb YAC Contig Spanning a Region Critical for the Monosomy 21 Phenotype in 21q21.3–q22.1. *Genomics* **43(1)**: 25-33.
- Oshiumi H, Sasai M, Shida K, Fujita T, Matsumoto M *et al.* (2003) TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem* **278(50)** : 49751-49762.
- Osman W, Laine S et Zilliacus J (2006) Functionnal interaction between the glucocorticoid receptor and GANP/MCM3AP. *Biochem Biophys Res Commun* **348**:1239-1244.
- Pangalos C, Théophile D, Sinet PM, Marks A, Stamboulieh-Abazis D *et al.* (1992) No significant effect of monosomy for distal 21q22.3 on the Down syndrome phenotype in "mirror" duplications of chromosome 21. *Am J Hum Genet*. **51(6)**: 1240-50.

- Parsons T, Ryan TM, Reeves RH, Richtsmeier JT (2007). Microstructure of trabecular bone in a mouse model for Down syndrome. *Anat Rec (Hoboken)* **290**: 414-421.
- Pereira P, Magnol L, Sahùn I, Brault V, Duchon A *et al.* (2009) A new mouse model for the trisomy of the Abcg1-U2af1 region reveals the complexity of the combinatorial genetic code of Down syndrome. *Hum Mol Genet* **18(24)**: 4756-4769.
- Peled-Kamar M, Lotem J, Okon E, Sachs L, Groner Y (1995). Thymic abnormalities and enhanced apoptosis of thymocytes and bone marrow cells in transgenic mice overexpressing Cu/Zn-superoxide dismutase: implications for Down syndrome. *EMBO J.* **14(20)**: 4985-93.
- Pinter JD, Eliez S, Schmitt JE, Capone GT, Reiss AL (2001). Neuroanatomy of Down's syndrome: a high-resolution MRI study. *Am J Psychiatry.* **158(10)**: 1659-65.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Van Huffel C, Du X (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282(5396)**: 2085-2088.
- Pueschel SM (1990) Clinical aspects of Down syndrome from infancy to adulthood. *Am J Med Genet Suppl.* **7**: 52-6.
- Rahmani Z, Blouin JL, Creau-Goldberg N, Watkins PC, Mattei JF *et al* (1989). Critical role of the D21S55 region on chromosome 21 in the pathogenesis of Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86(15)**: 5958-62.
- Ravindranath Y (2003). Down syndrome and acute myeloid leukemia: the paradox of increased risk for leukemia and heightened sensitivity to chemotherapy. *J Clin Oncol.* **21(18)**: 3385-7.
- Reeves RH, Irving NG, Moran TH, Wohn A, Kitt C *et al.* (1995). A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat Genet.* **11(2)**: 177-84.
- Richtsmeier JT, Zumwalt A, Carlson EJ, Epstein CJ, Reeves RH (2002). Craniofacial phenotypes in segmentally trisomic mouse models for Down syndrome. *Am J Med Genet.* **107(4)**: 317-24.

- Riegel M, Hargreaves P, Baumer A, Guc-Scekic M, Ignjatovic M *et al.* (2005) Unbalanced 18q/21q translocation in a patient previously reported as Monosomy 21. *Eur J Med Genet* **48(2)**: 167-74.
- Roizen NJ, Patterson D (2003) Down's syndrome. *Lancet*. **361(9365)**: 1281-9.
- Rovelet-Lecrux A., Hannequin D., Raux G., Le Meur N., Laquerrière A., Vital A., Dumanchin C., Feuillet S., Brice A., Vercelletto M., Dubas F., Frebourg T. et Campion D. (2006) APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nature Genetics*, 38(1):24-6.
- Sago H, Carlson EJ, Smith DJ, Kilbridge J, Rubin EM *et al.* (1998). Ts1Cje, a partial trisomy 16 mouse model for Down syndrome, exhibits learning and behavioral abnormalities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95(11)**: 6256-61.
- Sago H, Carlson EJ, Smith DJ, Rubin EM, Crnic LS *et al.* (2000). Genetic dissection of region associated with behavioral abnormalities in mouse models for Down syndrome. *Pediatr Res*. **48(5)**: 606-13.
- Salisbury JL (2004) Primary cilia: putting sensors together. *Curr Biol* **14**: R765-R767.
- Saran NG, Pletcher MT, Natale JE, Cheng Y, Reeves RH (2003). Global disruption of the cerebellar transcriptome in a Down syndrome mouse model. *Hum Mol Genet*. **12(16)**: 2013-9.
- Sasaki N, Toki S, Chowei H, Saito T, Nakano N *et al.* (2001) Immunohistochemical distribution of the receptor for advanced Glycation end products in neurons and astrocytes in Alzheimer's disease. *Brain Res* **888(2)**: 256-262.
- Satgé D, Sommelet D, Geneix A, Nishi M, Malet P, Vekemans M (1998) A tumor profile in Down syndrome. *Am J Med Genet*. **78(3)**: 207-16.
- Schmidt AM, Hasu M, Popov D, Zhang JH, Chen J *et al.* (1994) Receptor for advanced glycation end products (AGEs) has a central role in vessel wall interaction and gene activation in response to circulating AGE proteins. *Proc Natl Acad Sci* **91**: 8807-8811.

- Schimdt AM, Yan SD, Yan SF et Stern DM (2000) The biology of the receptor for advanced Glycation end products and its ligands. *Biochim Biophys Acta* **1498(2-3)**:99-111.
- Scott HS, Antonarakis SE, Lalioti M, Rossier C, Silver PA *et al.* (1998) Identification and characterization of two putative human arginine methyltransferases (HRMT1L1 and HRMT1L2). *Genomics* **48**:330-340.
- Sedaghat F et Notopoulos A (2008) S100 protein and its application in clinical practice. *Hippokratia* **12(4)**: 198-204.
- Shanmugam N, Kim YS, Lanting L, et Natarajan R (2003) Regulation of cyclooxygenase-2 expression in monocytes by ligation of the receptor for advanced glycation end products. *J. Biol Chem* **278**: 33444-33484.
- Shehata BM et Abrmowsky CR (2005) Alveolar Capillary Dysplasia in an Infant With Trisomy 21. *Pediatric and Developmental Pathology* **8**: 696–700.
- Sherman SL, Takaesu N, Freeman SB, Grantham M, Phillips C *et al* (1991). Trisomy 21: association between reduced recombination and nondisjunction.. *Am J Hum Genet.* **49(3)**: 608-20.
- Shield JP, Wadsworth EJ, Hassold TJ, Judis LA, Jacobs PA (1999) Is disomic homozygosity at the APECED locus the cause of increased autoimmunity in Down's syndrome? *Arch Dis Child.* **81(2)**: 147-50.
- Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K *et al.* (1999) MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* **189(11)**: 395-410.
- Smith D.J., Zhu Y., Zhang J., Cheng J.F. et Rubin E.M. (1995) Construction of a panel of transgenic mice containing a contiguous 2-Mb set of YAC/P1 clones from human chromosome 21q22.2. *Genomics*; **27(3)**:425-434.
- Smith D.J. et Rubin E.M. (1997) Functional screening and complex traits: human 21q22.2 sequences affecting learning in mice. *Human Molecular Genetics*; **6(10)**:1729-1733.

- Steiner J, Bernstein HG, Biellau H, Berndt A, Brisch R *et al.* (2007) Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain. *BMC Neurosci* **8**:2.
- Sullivan SG, Hussain R, Glasson EJ, Bittles AH (2007) The profile and incidence of cancer in Down syndrome. *J Intellect Disabil Res* **51(Pt 3)**: 228-31.
- Sungur M, Öcal B, Oguz, Karademir S, Karakur C *et al.* (2008) Plasma endothelin-1 and nitrate levels in Down's syndrome with complete atrioventricular septal defect-associated pulmonary hypertension: a comparison with non-Down's syndrome children. *Eur J Pediatr* **168**:593–597.
- Tejedor F., Zhu R., Kaltenbach E., Ackermann A., Baumann A., Canal I., Heisenberg M., Fischbach K.F. et Pongs O. (1995) *Minibrain*: a new protein kinase family involved in postembryonic neurogenesis in *Drosophila*. *Neuron*, **14**:287-301.
- Togbe D, Aurore G, Noulin N, Qesniaux VF, Schnyder-Candrian S *et al.* (2005) Nonredundant roles of TIRAP and MyD88 in airway response to endotoxin, independent of TRIF, IL-1 and IL-18 pathways. *Lab Invest* **86(11)**: 1126-1135.
- Togbe D, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, Doz E, Noulin N *et al.* (2007) Toll-like receptor and tumour necrosis factor dependent endotoxin-induced acute lung injury. *Int J Exp Pathol* **88(6)**: 387-391.
- Tracey KJ et Lowry SF (1990) The role of cytokine mediators in septic shock. *Adv Surg* **23**:21-56.
- Triantafilou M et Triantafilou K (2002) Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol* **23(6)**: 301-304.
- Uchida T, Shirasawa M, Ware L, Kojima K, Hata Y *et al.* (2006) Receptor for advanced Glycation end products is a marker of type I cell injury in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* **173(9)**: 1008-1015.
- Ulevitch RJ et Tobias PS (1995) Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* **13** : 437-457.

- Vanderbilt JN, Mager EM, Allen L, Sawa T, Wiener-Kronish J *et al.* (2003) CXC chemokines and their receptors are expressed in type II cells and upregulated following lung injury. *AM J Respir Cell Mol Biol* **29**(6): 661-668.
- Valencia JV, Mone M, Koehne C, Rediske J et Hughes TE (2004a) Bindings of receptor for advanced Glycation end products (RAGE) ligands is not sufficient to induce inflammatory signals: lack of activity of endotoxin-free albumin-derived advanced glycation end products. *Diabetologia* **47**: 844-852.
- Valencia JV, Mone M, Zhang J, Weetall M, Buxton F and Hughes TE (2004) Divergent pathways of gene expression are activated by the RAGE ligands S100B and AGE-BSA.
- Valero R, Marfany G, Gil-Benso R, de los Angeles Ibáñez M, López-Pajares I *et al.* (1999) Molecular characterisation of partial chromosome 21 aneuploidies by fluorescent PCR. *J Med Genet* **36**: 694.
- Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF *et al.* (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. **420**(6915): 520-62.
- Wechsler J, Greene M, McDevitt MA, Anastasi J, Karp JE *et al.* (2002) Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nat Genet*. **32**(1): 148-52.
- Wessels MW, Los FJ, Frohn-Mulder IM, Niermeijer MF, Willems PJ, Wladimiroff JW (2003) Poor outcome in Down syndrome fetuses with cardiac anomalies or growth retardation. *Am J Med Genet A*. **116**(2): 147-51.
- Wietek C, Miggin SM, Jefferies CA, O'Neill LA (2003) Interferon regulatory factor-3-mediated activation of the interferon-sensitive response element by Toll-like receptor (TLR) 4 but not TLR3 requires the p65 subunit of NF-kappa. *J Biol Chem* **278**(51): 50923-50931.
- Xiong Z, O'Hanlon D, Becker L, Roder J, MacDonald J *et al.* (2000) Enhanced calcium transient in glial cells in neonatal cerebellar cultures derived from S100B null mice. *Experimental Cell research* **257**: 281-289.
- Yamagata T, Maki K, Mitani K (2005) Runx1/AML1 in normal and abnormal hematopoiesis. *Int J Hematol*. **82**(1): 1-8.

- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K *et al.* (2003) TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signalling pathway. *Nat Immunol* **4(11)**: 1144-1150.
- Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J *et al.* (1994) Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced Glycation end products with their receptor/binding proteins. *J Biol Chem* **269**: 9889-9897.
- Yan SS, Wu ZY, Zhang HP, Furtado G, Chen X *et al.* (2003) Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by selective blockade of encephalitogenic T-cell infiltration of the central nervous system. *Nat Med* **9(3)**: 287-293.
- Yoshimoto T, Boehm M, Olive M, Crook MF, San H *et al.* (2006) The arginine methyltransferases Prmt2 binds RB and regulates E2F function. *Exp Cell Res* **312**: 2040-2053.
- Yu T, Li Z, Jia Z, Clapcote S, Liu C *et al.* (2010) A mouse model of Down syndrome trisomic for all human chromosome 21 syntenic regions. *Hum Mol Genet* Advance Access.

Annexes

Solutions stock courantes

TAE Tris acétate, EDTA 50X: Tris HCl 2M, acide acétique glacial 2M et EDTA 50mM.

EDTA 0,5M: Na₂EDTA 2H₂O 186,1g/L, pH 8.

Tris HCl 2M: Tris base 242,2g/L. La solution est ajustée au pH désiré avec du HCl concentré.

TE pH 8: Tris HCl 10mM pH 8 et EDTA 1mM pH 8.

NaCl 5M: NaCl 292g/L.

PBS 10X: NaCl 100g/L, KCl 5g/L, Na₂HPO₄ 14,4g/L et KH₂PO₄ 2,5g/L, pH 7,2.

STET: NaCl 0,1M, Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM et Triton X-100 5%.

Résine G50 séphadex: Du milieu G50 séphadex est complété avec de l'eau distillée stérile et la résine qui a gonflé est lavée plusieurs fois à l'eau distillée stérile. La résine est ensuite équilibrée dans du TE pH 7,6, autoclavée et stockée à température ambiante.

Tampons pour les méthodes de Southern et d'immunoblotting

SSC 20X: NaCl 175,3g/L et Na Citrate 88,2g/L, pH 7 (autoclavé).

Transfert A: NaOH 0,5M et NaCl 1,5M (autoclavé).

Transfert B: Tris HCl 0,5M pH 7,4, NaCl 1,5M et EDTA 1mM (autoclavé).

NaPi 1M: Na₂HPO₄ 2H₂O 178g/L, pH 7,2 (autoclavé).

Church: NaPi 0,5M, SDS 7% et EDTA 1mM (stocké à 65°C).

Lavage church: NaPi 40mM, SDS 1% et EDTA 0,5mM (stocké à 65°C).

Tampon I 10X: Acide maléique 116,1g/L, NaCl 87,67g/L et NaOH 75g/L, pH 7,5 (autoclavé).

Tampon I + Tween: tampon I 1X et Tween 0,3%.

Réactif de blocage 10X: tampon I 1X et réactif de blocage 50g/450ml (le réactif est dissout à environ 55°C et autoclavé).

Tampon II de blocage: tampon I 1X et réactif de blocage 1X.

Tampon II + anticorps anti-DIG: tampon I 1X, réactif de blocage 1X et 1/300 000 de dioxigénine.

Tampon III: Tris HCl 100mM et NaCl 100mM

Identification de gènes à effet de dose impliqués dans la pathophysiologie des aneuploïdies associées au chromosome 21

Résumé :

Une variation du nombre de copies des gènes du chromosome 21 humain (HSA21) entraîne des anomalies morphologiques et physiologiques d'un grand nombre d'organes chez les patients. La Trisomie 21, ou syndrome de Down et les monosomies partielles du HSA21 conduisent à des phénotypes complexes et variables. Afin d'identifier les gènes du HSA21 sensibles aux effets de dose, nous avons développé le modèle de monosomie Ms1Yah, pour la région *Prmt2-Col6a1* du chromosome murin 10 (MMU10). L'analyse de ce modèle a montré que les souris Ms1Yah développent une altération des réponses inflammatoire et pulmonaire suite à une instillation de lipopolysaccharide (LPS). L'analyse, par Q-PCR, de l'expression des gènes de la région a mis en évidence deux gènes candidats : *Prmt2* et *S100B*. Les lignées déficientes pour ces gènes ont été utilisées pour tester l'implication de *Prmt2* et *S100B* dans la modification de la réponse inflammatoire et pulmonaire en réponse au LPS. Ces travaux ont montré d'une part que *Prmt2* intervient dans la régulation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-6 de façon dose dépendante, via son rôle inhibiteur de la signalisation NF- κ B. D'autre part, *S100B* ne semble pas intervenir dans la réponse inflammatoire induite par le LPS, alors que son inactivation entraîne une diminution de l'hyper réponse des voies aériennes (HRA) de façon dose dépendante. La réponse inflammatoire serait la résultante du croisement de deux voies de signalisation : LPS-TLR4-NF- κ B-*Prmt2* et *S100B*-RAGE-NF- κ B. Il faudrait que la voie *Prmt2* soit en défaut pour observer un effet de *S100B* dans l'inflammation. L'injection d'un anticorps anti-*S100B* chez des souris B6 favorise une diminution de l'HRA induite par l'instillation de LPS. L'analyse préliminaire de l'utilisation de cet anticorps dans un modèle d'asthme montre là encore une capacité à diminuer l'HRA pour les doses les plus fortes de métacholine, ce qui laisse entrevoir le potentiel thérapeutique d'une telle molécule.

Mots clés : Trisomie 21, monosomie, modèle murin, *Prmt2*, *S100B*, effet de dose

Identification of dosage sensitive genes involved in physiopathology of aneuploidy linked to chromosome 21

Summary :

A copy number variation of genes from human chromosome 21 (HSA21) leads to morphological and physiological anomalies of a great number of organs among patients. Trisomy 21 or Down's syndrome, and partial monosomy of the HSA21 lead to complex and variable phenotypes. In order to identify dosage sensitive genes, we developed a model of monosomy for the *Prmt2-Col6a1* region of the murine chromosome 10 (MMU10). The analysis of this model showed that the Ms1Yah mice develop an alteration of the inflammatory and pulmonary responses after an instillation of LPS. The analysis, by Q-PCR, of the expression of the genes from the *Prmt2-Col6a1* area pinpointed two genes as candidates: *Prmt2* and *S100B*. The defective lines for these genes were used to test the implication of *Prmt2* and *S100B* in the modification of the inflammatory and pulmonary answer after LPS stimulation. This work showed on one hand that *Prmt2* is involved in the regulation of the expression of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 in a dose dependant manner, via its inhibitor role in the NF- κ B signalization. On the other hand, *S100B* does not seem to be involved in the inflammatory response induced by the LPS, whereas its inactivation induces a reduction in the hyper response of the airway, in a dose dependant manner. The inflammatory response would be the consequence of the crossing of two ways of signalization: LPS-TLR4-NF- κ B-*Prmt2* and *S100B*-RAGE-NF- κ B. It would be necessary that the *Prmt2* ways be defective to observe an effect of *S100B* in inflammation. The injection of an anti-*S100B* antibody in B6 mice showed a reduction in the HRA induced by an instillation of LPS. The preliminary analysis of the use of this antibody in a murin asthma model support its capacity to decrease the HRA for the strongest amounts of metacholin, showing the therapeutic potential of the molecule.

Keywords : Trisomy 21, monosomy, murin model, *Prmt2*, *S100B*, dosage effect

IEM CNRS UMR6218

3 b rue de la Ferrollerie
45071 ORLEANS cedex 2

IGBMC INSERM U964, UMR7104

Parc d'innovation, 1 rue Laurent Fries
67 404 ILLKIRCH cedex