



HAL
open science

Les cellules souches pluripotentes : des outils pour reproduire et étudier les étapes précoces du développement des réseaux de neurones humains.

Alexandra Benchoua

► To cite this version:

Alexandra Benchoua. Les cellules souches pluripotentes : des outils pour reproduire et étudier les étapes précoces du développement des réseaux de neurones humains.. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Evry-Val d'Essonne/Université Paris Saclay, 2019. tel-04584470

HAL Id: tel-04584470

<https://hal.science/tel-04584470>

Submitted on 23 May 2024

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

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

Les cellules souches pluripotentes : des outils pour reproduire et étudier les étapes précoces du développement des réseaux de neurones humains

Mémoire préparé en vue de l'obtention de l'Habilitation à Diriger les Recherches

Présenté par le Dr Alexandra BENCHOUA

Equipe « Neuroplasticité et Thérapeutiques »
CECS, ISTEM, AFM

Composition du Jury :

Pr Bruno Colombo Université d'Evry-Val d'Essonne, Département de Biologie	Président
Dr Marie-Pierre Junier Institut de Biologie Paris-Seine, UMR 8246	Rapporteur
Dr Sandrine Humbert Université Grenoble Alpes, Inserm U1216	Rapporteur
Dr Emmanuel Brouillet MIRcen, UMR 9199 CNRS/CEA	Rapporteur
Dr Gaelle Friocourt Université de Bretagne Occidentale, Inserm UMR1078	Examinateur
Dr Marc Peschanski ISTEM, CECS, AFM	Invité

« En avant, calme et droit. »

Général Alexis de l'Hotte

Devise des écuyers du cadre noir de Saumur

REMERCIEMENTS

Mes remerciements s'adressent en premier lieu aux membres du jury, Marie-Pierre Junier, Sandrine Humbert, Gaëlle Friocourt, Emmanuel Brouillet et Bruno Colombo qui ont accepté d'évaluer ce mémoire et de participer aux débats lors de sa prochaine soutenance orale. J'espère que vous trouverez de l'intérêt aux travaux qui y sont décrit et que vous me pardonneriez les fautes d'orthographe qui y sont semées. La dysorthographe dure toute la vie...

Ces travaux n'auraient pas été possibles sans ma formation préalable dans les laboratoires qui m'ont accueilli en thèse puis lors de mes deux expériences post-doctorat. Un grand merci à mes « mentors » Brigitte Onteniente, Emmanuel Brouillet (encore...) et Austin Smith pour m'avoir transmis savoir et savoir-faire. Je suis également reconnaissante à l'ensemble des membres de ces laboratoires qui m'ont tous appris quelque chose et contribué à faire la chercheuse que je suis aujourd'hui.

Un remerciement spécial à Marc Peschanski qui m'a non seulement accueilli en thèse mais aussi offert la possibilité de rejoindre ISTEM dès sa création. Une longévité exemplaire... Merci de me faire confiance depuis le début, de m'avoir proposé la responsabilité du projet « Roche » malgré les risques que comportaient un tel pari et de me laisser suivre mon chemin depuis.

On dit qu'un cavalier sans cheval n'est qu'un piéton. Il en est de même pour un chef d'équipe sans équipe, il n'est rien ! J'ai eu la chance de débiter avec une équipe incroyable, la fameuse équipe « Roche » ! Aurélie, Pauline et Claire. Vous êtes toute les trois si précieuses à mes yeux. Merci de m'avoir fait croire que j'étais une super « cheffe » et de m'avoir fait confiance. Bravo Pauline et Aurélie pour vos choix de carrière et vos beaux enfants, je suis si fière de vous. Et ma Claire, que te dire ! 10 ans, deux Boissart et al... d'autres à venir... Tu pourrais passer deux thèses. J'espère qu'on continuera comme ça encore 10 ans ! J'ai évidemment une pensée pour les autres membres qui ont étoffé et fait vivre cette équipe depuis 10 ans, en particulier Louise et Laure, toujours à mes côtés et dont le travail exemplaire et la gentillesse rendent ma vie si facile. Vous êtes vraiment incroyables.

Bien-sûr, les trois thésards encadrés durant cette période d'apprentissage resteront toujours dans mes souvenirs comme les valeureux « premiers ». Emeline, Hélène et Valentin, merci d'avoir essuyé les plâtres. Finalement, cela ne s'est pas trop mal passé ! Mes remerciements s'étendent à tous les étudiants « undergraduates » formés dans l'équipe et qui nous amusent toujours beaucoup !

Merci à l'ensemble des habitants d'ISTEM qui partage problèmes, solutions, discussions, manips, réunions ... et nourriture. Et à Sandrine qui partage ma chambre à chaque séminaire annuel depuis ... vraiment très longtemps.

Finalement, un immense merci à mon compagnon d'une vie, Sylvain. Merci de ne pas t'appeler Fabien ou Damien, de ne pas t'être sauvé pendant nos années de Bohème, d'être un papa moderne, de céder à tous mes caprices (le dernier faisant tout de même plus de 500 kg) et de n'en avoir absolument rien à faire des réseaux de neurones ! Merci à mes filles, Margot et Jeanne, d'être fière de leur maman et de rendre cette vie plus intense.

Table des matières

REMERCIEMENTS	2
PRESENTATION DU CANDIDAT	4
Position actuelle	4
Formation universitaire	4
Activités de Recherche	4
Production scientifique	5
Prix et distinctions	10
Collaborations Scientifiques depuis 2009	10
Contrats publics, associatifs ou industriels supportant les travaux de recherche	10
Encadrement de la recherche	11
Activités d'enseignement universitaires ou assimilées	12
Autres responsabilités Scientifiques et Administratives	13
I- RESUME CHRONOLOGIQUE DES TRAVAUX DE RECHERCHE	14
II- Travaux de recherches : les cellules souches pluripotentes : des outils pour reproduire et étudier les étapes précoces du développement des réseaux de neurones humains.....	17
II-1 : QUELQUES ELEMENTS D'INTRODUCTION	17
II-1. A- Troubles Neurodéveloppementaux	17
II-1. B- Cellules souches pluripotentes humaines.....	18
II-1.C- Les principales étapes du développement du système nerveux central	20
II-1. D- La recherche de modificateurs de la neurogénèse à haut débit et ces contraintes.....	26
II-2 : L'ACTIVATION DES MICRO-RNAS DE LA FAMILLE DE MIR-125 EST NECESSAIRE A UN ENGAGEMENT PRECOCE EFFICACE DES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES HUMAINES VERS LE LIGNAGE NEURAL	27
II-3 : OBTENTION DE NEURONES DES COUCHES SUPERIEURES DU CORTEX A PARTIR DES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES HUMAINES EXPLOITABLES POUR LA MODELISATION DES MALADIES NEUROPSYCHIATRIQUES ET LA RECHERCHE DE MOLECULES PAR CRIBLAGE A HAUT DEBIT	31
II-4 : L'INHIBITION DE LA PROTEINE KINASE A (PKA) EST SUFFISANTE POUR PERMETTRE L'AUTORENOUVELEMENT DES CELLULES SOUCHES NEURALES HUMAINES	37
II-5 : UTILISATION DES NEURONES DERIVES DES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES POUR L'IDENTIFICATION A HAUT DEBIT DE MOLECULES D'INTERET THERAPEUTIQUE POUR LES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUES : EXEMPLE DU SYNDROME DE L'HAPLOINSUFFISANCE DU GENE <i>SHANK3</i>	40
III- Projets de recherche en cours	45
III-1 : LA MALADIE DE LESCH-NYHAN : IMPLICATION DE L'ENZYME HGPRT DANS LE DEVELOPPEMENT NEURONAL.....	45
III-2 : TROUBLES NEURODEVELOPPEMENTAUX ASSOCIES AUX DYSTROPHINOPATHIES.....	50
IV- REFERENCES	55
V- ANNEXES: Articles décrits dans ce mémoire.....	61

PRESENTATION DU CANDIDAT

Alexandra BENCHOUA

Position actuelle

Chargée de recherche statutaire au Centre d'Etude des Cellules Souches (CECS)

Date de recrutement : 1^{er} Aout 2008

Responsable de l'équipe « Neuroplasticité et Thérapeutique » de l'Institut des cellules Souches pour le Traitement et l'Etude des maladies Monogéniques (I-STEM)

CECS, I-STEM, AFM

28 rue Henri Desbruères

91100 Corbeil Essonnes

Formation universitaire

2002 : Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, spécialité « Neurosciences »

Sujet de thèse : « Participation des caspases à la mort neuronale induite par une ischémie focale chez la souris ». Allocataire MESR.

2000 : D.E.A, spécialité « Neurosciences », Université Paris Est Créteil, Paris XII

1999 : Maitrise Biologie Cellulaire et Physiologie, Université Paris Est Créteil, Paris XII

Activités de Recherche

Aout 2008-présent : Chargée de Recherche, responsable du domaine émergent puis de l'équipe « Neuroplasticité et Thérapeutiques », laboratoire CECS, I-STEM, Evry (directeur du laboratoire : Dr Marc Peschanski).

Janvier 2007-Aout 2008: Chargée de recherche contractuelle INSERM, UMR U 861, I-STEM, Evry, équipe « Maladies neurodégénératives » dirigée par le Dr Anselme Perrier.

* Différenciation dirigée des cellules embryonnaires humaines à travers le lignage neural à l'aide de petites molécules chimiques (Brevet WO 2010/063848).

2005-Juin 2006 : Post-Doctorat à l'Institut de Recherche sur le Cellules Souches d'Edimbourg (Ecosse, Royaume-Uni) sous la direction du Pr Austin. G. Smith.

* Rôle de la voie Notch dans l'induction neurale des cellules embryonnaires humaines (Lowell, Benchoua et al., PLoS Biology, 2006)

2002-2004 : Post-Doctorat à l'URA CEA-CNRS 2210, Service Hospitalier Frédéric Joliot de l'Hôpital d'Orsay sous la direction du Dr Emmanuel Brouillet.

* Etude de l'atteinte mitochondriale dans un modèle génétique cellulaire de la maladie de Huntington basé sur la transduction par des vecteurs lentiviraux de cultures primaires de neurones de rat (Benchoua et al., MBoC, 2006 ; Benchoua et al., Human Molecular Genetics, 2008).

1999-2002 : D.E.A. puis Thèse dans l'Unité INSERM U421, CHU Henri Mondor, Faculté de Médecine de Créteil, Université Paris XII, sous la direction du Dr Brigitte Onteniente.

* Implication des caspases dans la mort neuronale post-ischémique chez la souris (Benchoua et al., Journal of Neurosciences, 2001 ; Benchoua et al., JBC, 2002 ; Benchoua et al., 2004)

Production scientifique

Revues à comité de lecture :

1: Gouder L, Vitrac A, Goubran-Botros H, Danckaert A, Tinevez JY, André-Leroux G, Atanasova E, Lemièrè N, Biton A, Leblond CS, Poulet A, Boland A, Deleuze JF, **Benchoua A**, Delorme R, Bourgeron T, Cloëz-Tayarani I.

Altered spinogenesis in iPSC-derived cortical neurons from patients with autism carrying de novo SHANK3 mutations. Sci Rep. 2019 Jan 14;9(1):94.

2: Quartier A, Chatrousse L, Redin C, Keime C, Haumesser N, Maglott-Roth A, Brino L, Le Gras S, **Benchoua A**, Mandel JL, Piton A.

Genes and Pathways Regulated by Androgens in Human Neural Cells, Potential Candidates for the Male Excess in Autism Spectrum Disorder. Biol Psychiatry. 2018 Aug 15;84(4):239-252.

3 : Darville H, Poulet A, Rodet-Amsellem F, Chatrousse L, Pernelle J, Boissart C, Héron D, Nava C, Perrier A, Jarrige M, Cogé F, Millan MJ, Bourgeron T, Peschanski M, Delorme R, **Benchoua A**.

Human Pluripotent Stem Cell-derived Cortical Neurons for High Throughput Medication Screening in Autism: A Proof of Concept Study in SHANK3 Haploinsufficiency Syndrome. EBioMedicine. 2016 Jul;9:293-305.

4: Rolland M, Li X, Sellier Y, Martin H, Perez-Berezo T, Rauwel B, **Benchoua A**, Bessières B, Aziza J, Cenac N, Luo M, Casper C, Peschanski M, Gonzalez-Dunia D, Leruez-Ville M, Davrinche C, Chavanas S.

PPAR γ Is Activated during Congenital Cytomegalovirus Infection and Inhibits Neuronogenesis from Human Neural Stem Cells. PLoS Pathog. 2016 Apr 14;12(4):e1005547

5: Gouder L, Tinevez JY, Goubran-Botros H, **Benchoua A**, Bourgeron T, Cloëz-Tayarani I.

Three-dimensional Quantification of Dendritic Spines from Pyramidal Neurons Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. J Vis Exp. 2015 Oct 10;(104).

6: Georges P, Boissart C, Poulet A, Peschanski M, **Benchoua A**.

Protein Kinase-A Inhibition Is Sufficient to Support Human Neural Stem Cells Self-Renewal. Stem Cells. 2015 Dec;33(12):3666-72.

7: Scordel C, Huttin A, Cochet-Bernoin M, Szelechowski M, Poulet A, Richardson J, **Benchoua A**, Gonzalez-Dunia D, Eloit M, Couplier M.

Borna disease virus phosphoprotein impairs the developmental program controlling neurogenesis and reduces human GABAergic neurogenesis. PLoS Pathog. 2015 Apr 29;11(4):e1004859.

8: **Benchoua A**, Peschanski M.

Pluripotent stem cells as a model to study non-coding RNAs function in human neurogenesis. Front Cell Neurosci. 2013 Aug 27;7:140.

9: Boissart C, Poulet A, Georges P, Darville H, Julita E, Delorme R, Bourgeron T, Peschanski M, **Benchoua A**.

Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening. Transl Psychiatry. 2013 Aug 20;3:e294.

10: Denis JA, Gauthier M, Rachdi L, Aubert S, Giraud-Triboulet K, Poydenot P, **Benchoua A**, Champon B, Maury Y, Baldeschi C, Scharfmann R, Piétu G, Peschanski M, Martinat C.
mTOR-dependent proliferation defect in human ES-derived neural stem cells affected by myotonic dystrophy type 1. J Cell Sci. 2013 Apr 15;126(Pt 8):1763-72.

11: Boissart C, Nissan X, Giraud-Triboulet K, Peschanski M, **Benchoua A**.
miR-125 potentiates early neural specification of human embryonic stem cells. Development. 2012 Apr;139(7):1247-57.

12: **Benchoua A**, Onteniente B.
Intracerebral transplantation for neurological disorders. Lessons from developmental, experimental, and clinical studies. Front Cell Neurosci. 2012 Jan 27;6:2.

13: **Benchoua A**, Trioulier Y, Diguët E, Malgorn C, Gaillard MC, Dufour N, Elalouf JM, Krajewski S, Hantraye P, Déglon N, Brouillet E.
Dopamine determines the vulnerability of striatal neurons to the N-terminal fragment of mutant huntingtin through the regulation of mitochondrial complex II. Hum Mol Genet. 2008 May 15;17(10):1446-56.

14: Lowell S, **Benchoua A**, Heavey B, Smith AG.
Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells. PLoS Biol. 2006 May;4(5):e121.

15: **Benchoua A**, Trioulier Y, Zala D, Gaillard MC, Lefort N, Dufour N, Saudou F, Elalouf JM, Hirsch E, Hantraye P, Déglon N, Brouillet E.
Involvement of mitochondrial complex II defects in neuronal death produced by N-terminus fragment of mutated huntingtin. Mol Biol Cell. 2006 Apr;17(4):1652-63.

16: Zala D, **Benchoua A**, Brouillet E, Perrin V, Gaillard MC, Zurn AD, Aebischer P, Déglon N. *Progressive and selective striatal degeneration in primary neuronal cultures using lentiviral vector coding for a mutant huntingtin fragment.* Neurobiol Dis. 2005 Dec;20(3):785-98.

17: **Benchoua A**, Braudeau J, Reis A, Couriaud C, Onténiente B.
Activation of proinflammatory caspases by cathepsin B in focal cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 2004 Nov;24(11):1272-9.

18: Onténiente B, Couriaud C, Braudeau J, **Benchoua A**, Guégan C.
The mechanisms of cell death in focal cerebral ischemia highlight neuroprotective perspectives by anti-caspase therapy. Biochem Pharmacol. 2003 Oct 15;66(8):1643-9.

19: Onténiente B, Rasika S, **Benchoua A**, Guégan C.

Molecular pathways in cerebral ischemia: cues to novel therapeutic strategies. Mol Neurobiol. 2003 Feb;27(1):33-72. Review.

20: **Benchoua A**, Couriaud C, Guégan C, Tartier L, Couvert P, Friocourt G, Chelly J, Ménissier-de Murcia J, Onténiente B.

Active caspase-8 translocates into the nucleus of apoptotic cells to inactivate poly(ADP-ribose) polymerase-2. J Biol Chem. 2002 Sep 13;277(37):34217-22.

21: Lukaszewicz AC, Sampaio N, Guégan C, **Benchoua A**, Couriaud C, Chevalier E, Sola B, Lacombe P, Onténiente B.

High sensitivity of protoplasmic cortical astroglia to focal ischemia. J Cereb Blood Flow Metab. 2002 Mar;22(3):289-98.

Chapitres de livre:

1: Pollard SM, **Benchoua A** and Lowell S. *Neural stem cells, neurons, and glia*. In Methods in Enzymology (2006). Edited by: Elsevier Inc.

2 : Nissan X and **Benchoua A**. Quantification of micro-RNA expression in neural stem cells using TaqMan assays. In Neural Stem Cell Assays (2015). Edited by: Wiley Blackwell.

Valorisation:

Brevet détenu par l'Association Française de lutte contre les Myopathies (AFM) :

Benchoua A, Aubry and Perrier. WO 2010/063848: Method and medium for neural differentiation of pluripotent cells. Brevet délivré en Europe sous le numéro EPO: 2 56 218

Communications orales invitées:

2019:

- Colloque Le Studium, Tours, Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs): From Disease Models to Mini-Organs: **Contribution of human pluripotent stem cells as model of neurodevelopmental disorders**

2017:

- 1^{ème} Convention Biotheralliance, Université Versailles Saint Quentin, Montigny-Le-Bretonneux **Human pluripotent stem cells for the study and treatment of autism**

2014:

- 2^{ème} Convention de l'Institut des Biothérapie (BIRD), Cité Universitaire Internationale de Paris- **Pluripotent Stem Cells to model neurological disorders of developmental origins**
- 3^{ème} congrès « Consensus in Pediatrics and Child Health », organisé par le consortium international : Global Initiative for Consensus in Pediatrics, Bangkok- **Human pluripotent stem cells & their potential role in treating neurodevelopmental disorders**
- External Seminar of the Center For Regenerative Medicine, Edinburgh, UK - **Pluripotent Stem Cells to model neurological disorders of developmental origins**
- Workshop Aviesan-ITMO Immunologie, Hématologie et Pneumologie, Paris - **Screening for neurogenesis modifiers using PSC-derived neuronal progenitors**

2013 :

- Séminaire d'enseignement à l'Université de Sao Paulo et à l'Université de Vitoria, Brésil - ***Pluripotent Stem Cells (PSC) to model neurological disorders of developmental origins, from basic research to high throughput drug discovery***
- Labex BioPsy annual meeting, Paris - ***Pluripotent Stem Cells (PSC) to model neurological disorders of developmental origins, from basic research to high throughput drug discovery***

2012:

- Séminaire à l'institut MirCen, Fontenay aux roses - ***Pluripotent Stem Cells (PSC) to model neurological disorders of developmental origins, from basic research to high throughput drug discovery***
- Présentation session plénière : Congrès de la Société Française de Cytométrie, Toulouse, France- ***Infection and neurogenesis: The contribution of pluripotent stem cells (PSC)***

2010 :

- Annual Congress of the European Federation of Neurological Societies (EFNS), Genève, Suisse- ***Human embryonic stem cells and their progenies as a model of human neurogenesis***

2009 :

- Séminaire au MRC Stem Cell Institute, Cambridge, Royaume-Uni - ***Human Embryonic stem cells as cellular tools to study neurological diseases***

2008 :

- Séminaire à l'Université de Cardiff, School of Biosciences, Cardiff, UK - ***Development of cellular tools derived from human ES cells to study neurological diseases***

2007 :

- Annual Congress of the European Federation of Neurological Societies (EFNS), Bruxelles, Belgique (travaux primés)- ***Mutant human embryonic stem cells as a tool for high throughput screening of therapeutic compounds in Huntington's disease***

Communications affichées (en tant que responsable de la recherche)

2018:

INSAR 2018, Rotterdam, Pays-Bas:

- ***Patient specific pluripotent stem cells-derived neurons as a biological resource to develop personalized medicine for autism spectrum disorders***
Hélène Darville, Aurélie Poulet, Frédérique Rodet-Amsellem, Laure Chatrousse, Julie Pernelle, Claire Boissart, Thomas Bourgeron, Marc Peschanski, Richard Delorme and Alexandra Benchoua

2017:

IMFAR 2017, San Francisco, USA:

- ***Systematic screening of pharmacological compounds in human pluripotent stem cells-derived neurons to identify patient-oriented treatment for autism: a proof of concept.*** Hélène Darville, Aurélie Poulet, Frédérique Rodet-Amsellem, Laure Chatrousse, Julie Pernelle, Claire Boissart, Thomas Bourgeron, Marc Peschanski, Richard Delorme and Alexandra Benchoua

FFSCR 2017, Paris, France:

- **Pluripotent stem cells and their neural progenies for drug discovery using high throughput screening in Lesch-Nyhan disease**
Valentin Ruillier, Johana Tournois, Gurvan Mahé, Claire Boissart, Alexandra Benchoua

2015:

ECNP Workshop on Neuropsychopharmacology for Junior Scientists in Europe, Nice, France:

- **A human pluripotent stem cell-derived neuronal model for characterization of pathways regulating the autism-related gene, SHANK-3.** Hélène Darville, Aurélie Poulet, Richard Delorme, Francis Coge, Mark J Millan, Thomas Bourgeron, Marc Peschanski and Alexandra Benchoua

13th Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Stockholm, Suède:

- **Using induced pluripotent stem cells modelling lesch-nyhan disease.** Emeline Julita, Claire Boissart, Marc Peschanski and Alexandra Benchoua

2014:

9th Forum of Neurosciences, Federation of European Neurosciences Societies (FENS), Milan, Italy:

- **Modeling dopaminergic depletion in Lesch-Nyhan disease using human induced pluripotent stem cells (hiPSC).** Emeline Julita, Claire Boissart, Marc Peschanski, and Alexandra Benchoua
- **Exploring SHANK-3 regulating pathways using human pluripotent stem cell-derived neurons.** Hélène Darville, Aurélie Poulet, Richard Delorme, Francis Coge, Mark J Millan, Thomas Bourgeron, Marc Peschanski and Alexandra Benchoua

6^{ème} Forum Annuel Scientifique du STEM POLE-DIM Biothérapie, Cité Universitaire Internationale, Paris:

- **Modeling dopaminergic depletion in Lesch-Nyhan disease using human induced pluripotent stem cells (hiPSC).** Emeline Julita, Claire Boissart, Marc Peschanski and Alexandra Benchoua

2012:

Congrès Annuel de la fondation IPSEN « Programmed cells : from basic neuroscience to therapy » :

- **Large scale identification of human neurogenesis modifiers using human embryonic stem cell-derived neural stem cells.** Claire Boissart, Aurélie Poulet, Pauline Georges, Yves Maury, Marc Peschanski, and Alexandra Benchoua.

2011 :

10^{ème} congrès de la Société Française des Neurosciences:

- **MiR 125 regulates Smad-4 protein levels and promotes early neural specification of human embryonic stem cell.** Claire Boissart, Xavier Nissan, Karine Giraut-Triboult, Marc Peschanski and Alexandra Benchoua
- **Methods to monitor neurogenesis using hESC-derived neural stem cells.** Pauline Georges, Claire Boissart, Aurélie Poulet, Karine Giraut-Triboult, Yves Maury, Marc Peschanski and Alexandra Benchoua

EMBO meeting: Advances in Stem Cell research, Institut Pasteur, Paris :

- **MiR 125 regulates Smad-4 protein levels and promotes early neural specification of human embryonic stem cell.** Claire Boissart, Xavier Nissan, Karine Giraut-Triboult, Marc Peschanski and Alexandra Benchoua
- **Methods to monitor neurogenesis using hESC-derived neural stem cells.** Aurélie Poulet, Pauline Georges, Claire Boissart, Karine Giraut-Triboult, Yves Maury, Marc Peschanski and Alexandra Benchoua

Prix et distinctions

2007 : Récipiendaire du prix USCHI TSCHABITSCHER PRIZE FOR YOUNG NEUROLOGISTS-catégorie Neurologie Clinique- au 11ème congrès de la Fédération des sociétés européennes de Neurologie (*European Federation of Neurological Society, EFNS*)

Collaborations Scientifiques depuis 2009

Collaborations avec des laboratoires académiques

- UMR 3571, CNRS, Institut Pasteur, Université Descartes : Gènes, Synapses et Cognition, Paris : **Pr Thomas Bourgeron**. Génétique de l'autisme, accès aux familles multiplexes, diversité des atteintes synaptiques dans l'autisme.
- APHP, Hôpital Robert Debré, Paris : **Pr Richard Delorme**. Recrutement des donneurs pour les productions d'iPSC des cohortes autistes et Profil clinique des individus inclus dans ces cohortes.
- Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire (IGBMC) de Strasbourg, Médecine Translationnelle et Neurogénétique, Mécanismes génétiques des maladies neuro-développementales : **Pr Jean-Louis Mandel et Dr Amélie Piton**. Influence des androgènes sur la neurogénèse, le développement du retard mental et l'autisme.
- UMR 1043, Centre de physiopathologie de Toulouse Purpan, CHU Purpan : Dr **Stéphane Chavanas**. Mécanismes pathologiques associés à l'infection in utero par le virus CMV et le virus Zika.
- Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, ONIRIS, UMR 703, Physiopathologie Animale et Biothérapie du muscle et du système nerveux : **Pr Marie-Anne Colle**. Modèle animal phénotypique de la maladie de Lesch-Nyhan, étude préclinique de thérapie génique pour la maladie de Lesch-Nyhan.
- Centre de Recherche en Cancérologie Lyon-Est, CNRS UMS 3453 et INSERM US7 : **Dr Mathieu Gabut**. Diversité du transcriptome des cellules souches
- Ecole Nationale Vétérinaire de d'Alfort, UMR1161 Neuro-Virologie des Zoonoses : **Dr Muriel Culpier**. Etude de l'influence des virus zoonotiques sur la neurogénèse humaine et le développement de maladies psychiatriques

Collaborations avec des laboratoires pharmaceutiques ou sociétés de biotechnologies

- Roche Pharma Research & Early Development, Roche Innovation Center Basel, F.Hoffmann-La Roche Ltd, Bâles, Suisse (neurogénèse, autisme, Criblage à haut Débit).
- Institut de Recherche Servier, Croissy sur Seine, France (maladies psychiatriques, autisme, pharmacologie)
- Sanofi/Ksilink, Strasbourg, France (autisme, criblage à haut débit)
- Pierre Fabre, Castres, France (Lesch-Nyhan Disease, criblage à haut débit, composés naturels)

Contrats publics, associatifs ou industriels supportant les travaux de recherche

Contrats propres :

- Deux contrats de recherche collaborative avec F.Hoffmann-La Roche Ltd (laboratoire Roche, Bâles, Suisse): 2009-2012 : programme «HTS for Neurogenesis Modifiers» (responsable de l'équipe projet, porteur du projet : Marc Peschanski) / 2014-2018 : Programme « From iPSC to Phenotypes in Neurological Disorders » (Porteuse du projet).

- Contrat collaboratif avec L'Institut de Recherche Servier, Croissy sur Seine, France. Cellules souches pluripotentes pour l'étude des troubles du spectre autistique. Financement de la thèse d'Hélène Darville (durée 3 ans de 2012 à 2015)
- Contrat de Recherche collaboratif avec Sanofi et la plateforme Ksilink, Strasbourg, France. Cellules souches pluripotentes et criblage phénotypique de molécules pour les troubles du spectre autistiques (durée prévisionnel de 5 ans de 2018 à 2023).
- Bourse de thèse du Stem-pôle/ DIM Biothérapie, région île de France. Financement de la thèse d'Emeline Julita (2012 à 2015)
- Bourse Lesch-Nyhan action : Financement de la Thèse de Valentin Ruillier (2016-2019).

Contrats collaboratifs :

- ANR Samenta 2013 (santé mentale) : Projet SynDIV Autism (Porteur du projet Pr Thomas Bourgeron). Etude de la diversité des atteintes synaptiques chez les personnes autistes. Durée : 3 ans.
- Programme National d'Investissement d'Avenir phase I : Projet IngeStem- (Porteur du projet Pr Anne-Lise Bannaceur). Création d'une Plateforme Nationale pour la production et l'exploitation des cellules souches induites à la pluripotence. Durée : 5 ans
- ANR Programme Blanc 2011 : Projet HartaGène (Porteur du projet : Pr Jean Louis Mandel). Etude de l'implication des androgènes dans le développement du retard mental et de l'autisme. Durée 3 ans.
- Contrat de Recherche OSEO 2011 : Projet PrinciPS (porteur du projet : EctyCell, Evry, France). Industrialisation des cellules souches induites à la pluripotence et de leur progénie. Durée 2 ans
- La Ligue Nationale de Lutte contre le Cancer, financement des Projet Pluri Equipe (PPE) 2013 (porteur du projet : Dr Mathieu Gabut). Caractérisation de la diversité fonctionnelle du transcriptome des cellules souches cancéreuses à l'origine des glioblastomes. Durée 2 ans.

Encadrement de la recherche

Depuis 2009, date de la prise en charge de mon équipe de recherche, j'ai encadré les activités de recherche de neuf étudiants, une technicienne supérieure, sept ingénieurs et une chercheuse.

Composition de l'équipe Neuroplasticité et Thérapeutiques au 1er janvier 2019:

	Prénom, Nom	Statut	Début d'activité	Programme
STATUTAIRE	Laure Chatrousse	Chercheur associé, CECS	Juin 2014	Autisme
	Claire Boissart	Ingénieure RxD, CECS	Mai 2009	Lesch-Nyhan
CONTRACTUELS	Céline Leteur	Ingénieur étude, CDD INSERM	Novembre 2015	ToxSeq
ETUDIANTS	Valentin Ruillier	Thèse, ED569 ADIT, MESR	Juin 2016	Lesch-Nyhan
	Louise François	Master 2, BTCG, UPEC	Janvier 2017	Autisme

Précédant membres :

	Prénom, Nom	Statut	Début/Fin d'activité	Programme
STATUTAIRE	Aurélié Poulet	Ingénieure RxD, CECS	Mai 2009/ Septembre 2014	Roche + Autisme
	Pauline Georges	Ingénieure RxD, CECS	Mai 2009/ Septembre 2012	Roche (Neurogenesis)
	Karine Giraud-Triboult	Ingénieure RxD, CECS	Juin 2010/ Janvier 2011 puis Novembre 2015/Janvier 2017	Roche (Neurogenesis)
CONTRACTUELS	Soizic Ménard	Ingénieure RxD, INSERM	Mars 2013/Mars 2014	IngeStem (HCS)
	Julie Pernelle	Ingénieure RxD, INSERM	Mars 2014/Septembre 2015	Roche (iPSC)
	Céline Lepeigneux	Technicienne supérieure, CECS	Septembre 2014/Juin 2015	Roche (iPSC)

Etudiants par ordre chronologique (dont étudiants en Thèse):

Prénom, Nom	Période Universitaire	Niveau	Université/Ecole
Kévine Prèteseille	2009/2010	Master 1	Evry
Benjamin François	2010/2011	Ingénieur 2 ^{ème} année	EBI
<u>Emeline Julita</u>	<u>2011/2015</u>	<u>Master 2-Pro puis Thèse</u>	<u>Evry</u>
Mélanie Le Diagon	2011/2012	Equivalent L3	Sao-Paulo, Brésil
<u>Hélène Darville</u>	<u>2012/2015</u>	<u>Thèse</u>	<u>Evry</u>
Dimitri Dumontier	2013/2014	Master 1	Rouen
Marie-Madeleine Trottier	2015/2016	L3	Paris VII
Louise François	2017/2018	Master 2	UPEC, Paris XII
Marie Lasbareilles	2018/2019	5eme année Pharmacie	Paris V
Alice Lemontey	2018/2019	L3	U-PSUD

Activités d'enseignement universitaires ou assimilées

- Depuis 2010 : Cours Magistraux à l'école d'ISTEM (public : Etudiants en thèse et master, post-doc et chercheurs du campus Génopôle, heures de cours validées en tant qu'heure ECTS).
- 2012/2013 : Cours magistral, Master 2 de Biothérapie, Université Descartes Paris V, Dr Franck Griscelli
- 2011-2013: Cours magistral, D.U de Thérapie Cellulaire, Université Diderot Paris VII, Pr Christine CHOMIENNE - Dr Christine DOSQUET - Dr Jérôme Larghero
- 2015/2016 : DIU Maladies Rares : De la Recherche aux traitements, coordinateur Pr Eric Hachulla (Fondation maladies rares).

Autres responsabilités Scientifiques et Administratives

Activités d'expertise :

- Referee pour : Development, BMC Neurosciences, Regenerative Medicine, Molecular and Cellular Neurosciences
- Expert pour l'évaluation des dossiers de candidature aux appels d'offre de l'AFM
- Expert pour l'évaluation des dossiers candidature aux appels d'offre de l'Agence de la Biomédecine
- Expert pour les évaluations des dossiers de candidature aux appels d'offres du Labex de l'Université de Toulouse
- Membre du comité et du Jury de thèse de Chloé Scordel, Equipe neuro-virologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort. Encadrants : Pr M. Eloit et Dr M. Couplier.
- Membre du comité et du Jury de thèse d'Angélique Quartier, Equipe Médecine translationnelle et neurogénétique, Mécanismes génétiques des maladies neuro-développementales, Encadrants : Pr J.L. Mandel et Dr A. Piton

Activités administratives au sein d'ISTEM :

- Membre du comité de direction d'ISTEM
- Rédaction des demandes d'autorisation d'utilisation des cellules souches embryonnaires humaines auprès de l'Agence de Biomédecine et des demandes d'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques auprès du Ministère de la Recherche.
- Budgétisation et suivi des budgets des programmes de recherche de mon équipe et des contrats collaboratifs.

I- RESUME CHRONOLOGIQUE DES TRAVAUX DE RECHERCHE

Diplômée de Biologie Cellulaire et Physiologie à l'université Paris XII, j'ai choisi de me spécialiser en Neurosciences et de réaliser mon cursus de doctorat dans l'unité INSERM U421 du Dr Marc Peschanski, à la faculté de médecine de Créteil. J'ai réalisé mon DEA puis ma thèse dans l'équipe du Dr Brigitte Onteniente sur la thématique des accidents vasculaires cérébraux de Septembre 1999 à Octobre 2002. J'y ai plus particulièrement étudié *in vivo*, dans un modèle murin d'ischémie provoquée par l'occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne, les voies de signalisation aboutissant à la mort des neurones dans le territoire vascularisé par cette artère. Ces travaux nous ont permis de démontrer la large implication des protéases de la famille des caspases dans la formation de l'infarctus consécutif à l'occlusion de l'artère puis nous ont amené à décrire les différentes cascades mettant en jeu ces protéases ^[2, 3, 4]. Ils ont depuis permis à l'équipe du Dr Onteniente de démontrer qu'une approche protéique visant à bloquer de manière ciblée l'activation de ces protéases était efficace pour réduire l'étendue de la lésion post-ischémique chez le rongeur ^[5, 6]. A l'issue de cette expérience, la biologie cellulaire étant à la base de ma formation, et ayant largement été confrontée à la difficulté de mener des études mécanistiques fines *in vivo*, j'ai souhaité m'orienter vers le développement et l'étude de modèles cellulaires de réseaux de neurones.

J'ai rejoint, entre Décembre 2002 et Décembre 2004, l'équipe du Dr Emmanuel Brouillet, au sein d'une unité pluridisciplinaire, l'URA CEA-CNRS 2210 à Orsay, pour travailler sur la maladie de Huntington. Cette équipe travaillait depuis des années sur des modèles animaux phénotypiques de cette affection neurodégénérative (modèles basés sur l'administration de toxines à des rongeurs ou à des primates) et testait divers approches neuroprotectrices. Afin de compléter ces études par une approche génétique, nous avons travaillé, en collaboration avec le Dr Nicole Déglon de l'école polytechnique de Lausanne, à l'élaboration d'un modèle basé sur l'introduction à l'aide de vecteur lentiviraux du gène codant la huntingtine mutée, protéine toxique responsable de la dégénérescence neuronale dans la maladie de Huntington, dans des cultures primaires de neurones striataux de rat ^[7]. Ce modèle cellulaire de dégénérescence progressive de neurones striataux nous a permis d'établir le lien entre l'expression de la forme mutée de la Huntingtine et une atteinte directe du métabolisme mitochondriale, via la déplétion sélective des protéines constituant le complexe II de la chaîne respiratoire ^[8, 9]. Cette première expérience post-doctorale m'a conforté dans mon envie de poursuivre mes travaux sur l'élucidation des mécanismes sous-tendant les maladies neurologiques d'origine génétique en utilisant des modèles cellulaires pertinents de ces maladies. Toutefois, ces deux années m'ont aussi montré les limites d'utiliser des neurones primaires de rongeur comme ressource biologique pour créer de tels modèles.

En août 2004, la révision de la Loi de Bioéthique a alors permis d'envisager d'utiliser pour ces études des lignées de cellules souches embryonnaires humaines, isolées pour la première fois à partir de blastocystes par le Pr Thomson en 1998 ^[10], comme ressource pour produire à façon des neurones humains *in vitro*. De telles lignées ayant été importées en 2005 par le Dr Marc Peschanski à ISTEM, j'ai donc eu pour projet de rejoindre ce laboratoire. Toutefois, le manque de recul et de savoir-faire des équipes françaises concernant la différenciation dirigée de ces cellules pluripotentes dans le lignage neuronale m'a encouragé à intégrer pour une période de 18 mois le laboratoire du Pr Austin Smith à Edimbourg au Royaume-Uni, ce laboratoire étant l'un des pionnier dans l'élucidation des mécanismes moléculaires contrôlant la balance entre le maintien de la pluripotence et le choix d'un engagement précoce des cellules embryonnaires dans un lignage donné. Cette expérience m'a permis de maîtriser la culture des cellules pluripotentes humaines, de participer à l'ébauche des premiers protocoles

permettant leur engagement dans le lignage neurale et de mener les premières études visant à identifier les acteurs moléculaires responsables de leur conversion en cellules neuro-épithéliales ^[11].

En Janvier 2007, j'ai finalement rejoint le laboratoire ISTEM à Evry en tant que chercheur junior, ce qui m'a permis de poursuivre pendant un peu plus d'un an mes travaux de recherche d'un protocole efficace pour permettre la conversion synchronisée et homogène de l'ensemble des cellules souches pluripotentes en cellules neuro-épithéliales (Benchoua, Aubry et Perrier, Brevet international WO 2010/063848). En Aout 2008, mon recrutement en tant que statutaire par le CECS à ISTEM, m'a permis de développer ma propre thématique de recherche, orientée vers l'utilisation des cellules souches pluripotentes humaines et de leur progénie neurale pour modéliser les maladies neurodéveloppementales, en prenant la responsabilité successivement d'un domaine émergent au sein de l'institut (2008) puis d'une équipe de recherche (2009).

La possibilité de contrôler l'entrée des cellules pluripotentes dans le lignage neural nous a tout d'abord offert la possibilité d'étudier le rôle d'acteurs moléculaires, les micro-ARNs (miRNAs), dans cette prise de décision. Nous avons notamment démontré le rôle clé des micro-ARNs miR-125 a et b dans la synchronisation de cette transition phénotypique (article#1 ^[12]). Ceci nous a aussi permis de contrôler la régionalisation des cellules neuro-épithéliales ainsi produites afin d'obtenir de manière efficaces des progéniteurs du télencéphale dorsale capables, après retrait des facteurs permettant leur auto renouvellement, de produire à quasi homogénéité des neurones des couches supérieures du cortex cérébral (article#2 ^[13]).

Entre 2009 et 2012, sous l'impulsion d'un partenariat avec le groupe pharmaceutique Roche, nous avons amené progressivement ces protocoles de différenciation neuronale vers une utilisation pour le criblage à haut débit de petites molécules. L'objectif du partenariat avec les scientifiques du groupe Roche était d'utiliser les progéniteurs et neurones corticaux dérivés des cellules hESC comme ressource biologique afin d'identifier, parmi la chimiothèque de Roche, les molécules susceptibles de modifier la neurogenèse et d'augmenter la production de neurones matures, en vue d'identifier des candidats médicaments pour le traitement d'affections telles que la maladie d'Alzheimer ou la dépression. En parallèle, nous avons utilisé ce système couplant la différenciation des hESC en format miniaturisé et l'analyse d'images automatisée à haut débit (High Throughput and High Content Screening, HTS-HCS) pour identifier des voies de signalisation contrôlant l'autorenouveau des progéniteurs corticaux (article #3 ^[14]).

En 2007, l'émergence des cellules souches induites à la pluripotence humaines (iPSC, ^[15]), reprogrammées directement à partir de cellules somatiques adultes, offrait la possibilité sans précédent d'étendre notre modélisation du développement des circuits neuronaux à n'importe quelles situations pathologiques. J'étais particulièrement intéressé par les troubles du spectre autistique (TSA) et j'ai commencé en 2012 à collaborer avec le groupe du Pr Thomas Bourgeron à l'Institut Pasteur à Paris. Entre 2012 et 2016, nous nous sommes intéressés au syndrome de Phelan-McDermid (SPMD) induit par l'haploinsuffisance du gène synaptique *SHANK3*. La présentation clinique de ce syndrome inclut un retard mental et des troubles du spectre autistique. Nous avons, dans un premier temps, démontré qu'il était possible de dériver des iPSC à partir de fibroblastes de peau de malades atteints du SPMD puis de reconstituer in vitro de réseaux de neurones fonctionnels à partir de ces cellules afin de les comparer à des individus sains ^[13]. Dans un second temps, nous avons utilisé ces cellules, en parallèle de neurones dérivés de cellules hESC, pour identifier, parmi 200 molécules repositionnables, celles permettant de restaurer l'expression synaptique de *SHANK3* et la normalisation des défauts de connectivité associés à l'haploinsuffisance. Le lithium a été sélectionné puis prescrit avec succès à une adolescente atteinte du SPMD dans le cadre d'une collaboration avec le Pr Richard Delorme. Ce travail

a fait la preuve de principe que les neurones dérivés des hPSC peuvent servir de support à une médecine de précision pour des troubles neurodéveloppementaux complexes d'origine génétique (article#4 ^[16]) et débouché sur l'obtention d'une subvention du PHRC (Programme Hospitalier de Recherche Clinique) afin de mener un essai clinique de phase I sur 20 malades.

Dans la suite de cet exposé, je détaillerai plus spécifiquement les travaux menés à ISTEM depuis 2009 en tant que chercheur autonome et responsable de travaux de recherche. J'exposerais aussi les travaux en cours dans mon équipe qui visent à élucider le rôle de gènes impliqués dans les troubles neurodéveloppementaux dans la constitution et le maintien des réseaux de neurones.

II- Travaux de recherches : les cellules souches pluripotentes : des outils pour reproduire et étudier les étapes précoces du développement des réseaux de neurones humains

II-1 : QUELQUES ELEMENTS D'INTRODUCTION

II-1. A- Troubles Neurodéveloppementaux

Les maladies neurodéveloppementales ou troubles neurodéveloppementaux (TND) constituent un ensemble de conditions pathologiques résultant d'un défaut de développement du système nerveux central. Les manifestations cliniques apparaissent en général lors de la petite enfance et avant l'entrée à l'école. Elles se caractérisent par un retard de développement et se traduisent par des atteintes cognitives, comportementales et sensorimotrices. Parmi ces troubles neurodéveloppementaux, le chapitre 1 du DSM-V caractérise:

- Les troubles du développement intellectuel pouvant être léger, modéré, sévère ou profond associé à un retard global de développement.
- Les troubles de la communication incluant les troubles du langage, de la parole, de la fluence et de la pragmatique du langage.
- Les troubles du spectre autistique (TSA) qui constituent une catégorie de pathologies à continuum – du plus au moins sévère – caractérisés par : une absence de compétences dans les interactions sociales et interpersonnelles et la présence de comportements restreints et répétitifs. Le syndrome d'Asperger et les troubles envahissant du développement appartiennent à cette catégorie.
- Les troubles des fonctions exécutives tel que le trouble de l'attention avec/sans hyperactivité
- Les troubles spécifiques des apprentissages (les DYS-) avec difficultés en lecture (dyslexie), avec difficultés en écriture (dysorthographe), avec difficultés en mathématiques (dyscalculie) ou difficulté de l'exécution de mouvements fins (dyspraxie)
- Les troubles moteurs affectant le développement de la coordination, le syndrome Gilles de La Tourette et autres Tics moteurs ou vocaux.
- Autres troubles neurodéveloppementaux non spécifiés

La charge mondiale de morbidité des TND, évaluée par l'OMS entre 1990 et 2010 (Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study 2010, ^[17]), s'élevait à 184 millions d'années soit 7.4% du total des années de vie perdues pour cause de décès précoce ou d'invalidité (échelle des DALY), toutes causes confondues. Les TND représentent donc un réel problème de santé publique. L'expression d'un TND peut être le résultat d'une ou plusieurs mutations génétiques (cause génétique), de l'exposition *in utero* à un agent tératogène ou pathogène (cause environnementale), à des modifications épigénétiques, voire, le plus souvent, à une combinaison de l'ensemble de ces facteurs. Si l'on combine cette variabilité des causes à la complexité des mécanismes sous-tendant le développement du cerveau humain, on perçoit la difficulté de modéliser fidèlement ces maladies au laboratoire afin de mieux les comprendre et donc les combattre.

Le fonctionnement cérébral est le résultat de l'établissement finement régulé de circuits neuronaux fonctionnels via, notamment, la formation des synapses ^[18]. La force de ces synapses est elle-même constamment affinée en fonction de l'activité neuronale liée à l'expérience, un processus adaptatif appelé plasticité synaptique ^[19]. Cette construction de réseaux de neurones complexes, modulés en

permanence, est à la base des processus cognitifs élaborés comme la mémoire, l'apprentissage, l'acquisition du langage ou le décryptage des relations sociales. Les maladies neurodéveloppementales résultent d'un défaut de formation ou de fonctionnement de ces réseaux de neurones. Le développement de réseaux neuronaux fonctionnels nécessite un équilibre délicat entre la prolifération et la différenciation des progéniteurs neuronaux, leur migration et intégration dans les sites appropriés puis la formation et l'affinage des connections neuronales, un ensemble de processus appelé neurogenèse [20]. Le fonctionnement des réseaux de neurones est aussi conditionné à l'interaction de ces cellules avec les cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes...) elles aussi formées au cours de la neurogenèse. On distingue traditionnellement la neurogenèse primaire, qui intervient dans la période anténatale et les premières années de vie et qui contribue à la construction du cerveau adulte, et la neurogenèse secondaire, qui persiste dans certaines zones du cerveau comme l'hippocampe ou intervient à la suite de la survenue d'une lésion du système nerveux. Dans les troubles neurodéveloppementaux, c'est la neurogenèse primaire qui est compromise [21, 22]. Une des problématiques de la modélisation des TND *in vitro* réside donc dans la capacité à répliquer la constitution des réseaux de neurones humains, en respectant certaines étapes clés, parfois très précoces, du développement propre à l'espèce. En ce sens, les cellules souches pluripotentes humaines (*human Pluripotent Stem Cells*, hPSC) représente un substrat biologique de choix.

II-1. B- Cellules souches pluripotentes humaines

Comme toutes les cellules souches, cellules fondatrices des tissus, les cellules souches pluripotentes possèdent une capacité d'autorenouveau en théorie illimitée. Ceci permet de les amplifier efficacement *in vitro* sans modifier leur génome et d'obtenir une masse cellulaire significative. Le terme pluripotent caractérise leur potentiel à produire à terme tous les types cellulaires présents dans un organisme après la naissance [23]. On peut donc, toujours en théorie, les différencier pour obtenir n'importe quel lignage cellulaire y compris les plus difficiles d'accès comme les cellules neurales (**Figure 1**).

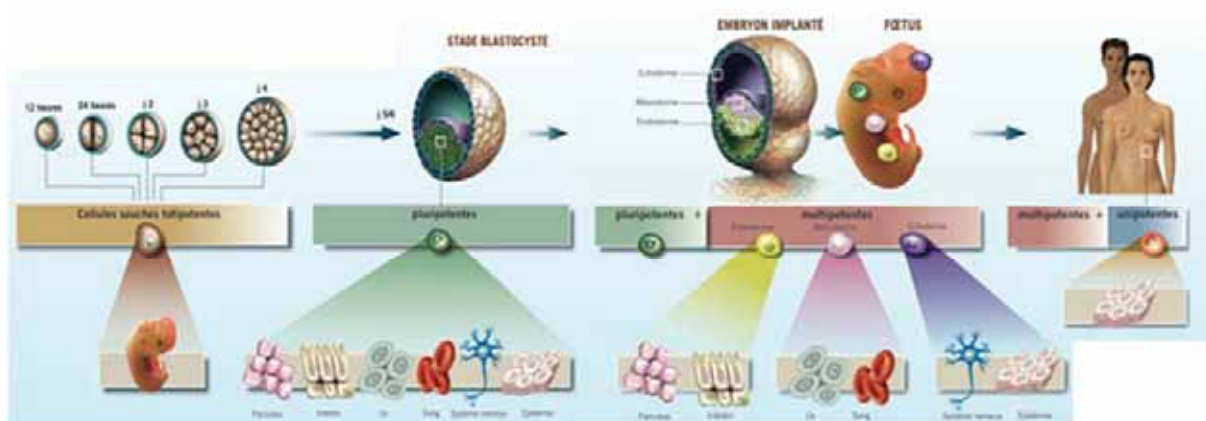


Figure 1 : Les différents types de cellules souches et leur potentiel de différenciation au cours du développement humain (adapté d'une iconographie du magazine Science et Vie).

Lorsque ces cellules sont humaines, elles permettent en plus d'adresser des questionnements relatifs à des processus qui peuvent être propres à cette espèce, notamment concernant l'implication d'une

voie de régulation ou de réseaux de gènes dans l'établissement d'une identité cellulaire. On peut donc en théorie, amplifier ces cellules puis récapituler certaines étapes aboutissant au final à la constitution d'un réseau de neurones d'intérêt et, à chaque étape, avoir le matériel nécessaire pour disséquer les événements moléculaires gouvernant la régulation de ces transitions phénotypiques ou l'homéostasie des types cellulaires obtenus.

Les hPSC physiologiques sont présentes dans l'embryon humain avant implantation au stade du blastocyste soit entre le 5^{ème} et le 7^{ème} jour post-fécondation. En 1998, l'équipe du Pr Thomson (Université du Wisconsin) a réussi à isoler la masse interne de blastocystes humains exclus d'un processus de fécondation *in vitro* (FIV) et à maintenir en culture les premières lignées de cellules souches embryonnaires humaines (*human Embryonic Stem Cells*, hESC, ^[10] **Figure 2**). En France, les deux révisions successives de la loi de bioéthique, en 2004 puis en 2012, autorisent, sous conditions d'obtention d'agrément par l'agence de biomédecine, l'utilisation des hESC à des fins de recherche lorsqu'elles sont susceptibles de permettre des progrès thérapeutiques majeurs et à condition de ne pouvoir poursuivre cette recherche par des méthodes alternatives. Malgré les difficultés d'accès à ces cellules du fait d'une ressource limitée et toujours questionnée d'un point de vue éthique et philosophique, les hESC restent le matériel biologique de référence lorsque l'on souhaite élucider les mécanismes du développement précoce de l'humain. L'étude du comportement de ces cellules *in vitro* a notamment permis d'identifier un groupe de facteurs de transcriptions responsables du maintien de l'état pluripotent indifférencié, appelés gènes de pluripotence, incluant Oct3/4, Nanog, KLF-4 et SOX2 ^[24, 25, 26]. Cette compréhension de plus en plus fine des mécanismes contrôlant la pluripotence a abouti en 2006 chez la souris puis 2007 chez l'Homme à l'émergence d'une nouvelle ressource de cellules souches pluripotentes. Les travaux pionniers du Pr Yamanaka au Japon ont en effet décrit une méthode permettant la reprogrammation de cellules somatiques adultes en cellules possédant certaines propriétés cardinales des hESC, notamment les capacités d'autorenouvellement et de pluripotence, en surexprimant les gènes de pluripotence Oct3/4, Sox2, Klf4 en combinaison de c-Myc. Ces cellules produites au laboratoire sont appelées cellules souches induites à la pluripotence (*human induced Pluripotent Stem Cells*, hiPSC, **Figure 2**, ^[27, 28]). Cette technologie s'est désormais largement démocratisée et de nombreuses équipes ont publiées l'obtention d'hiPSC à partir d'une large variété de donneurs sains ou présentant une pathologie à modéliser. Cette révolution a valu à son auteur le Prix Nobel de Médecine et de Physiologie en 2012 au côté du Pr Thomson.

Les hiPSC ont créé une réelle rupture dans l'utilisation des hPSC pour la modélisation des pathologies humaines *in vitro* puisqu'il est en théorie possible de les reprogrammer à partir de n'importe quel donneur après obtention de son consentement (ou de celui de ses représentants légaux), à partir de cellules somatiques prélevées de manière peu ou pas invasive (sang, biopsie de peau, pulpe dentaire, bulbe de cheveux...) et sans induire la destruction d'un embryon humain. Toutefois, la reprogrammation induite en laboratoire reste souvent imparfaite et peut compromettre l'interprétation des résultats obtenus à partir de ces cellules, en particulier d'une empreinte épigénétique qui peut être persistante. Il convient donc, au maximum, de conserver un référentiel avec les hESC lorsque l'on étudie des processus physiologiques (biologie du développement, mise au point de protocoles de différenciation...) ou des contrôles isogéniques (RNAi, CRISPR/Cas9...) lorsque l'on étudie l'impact d'une mutation ^[29].

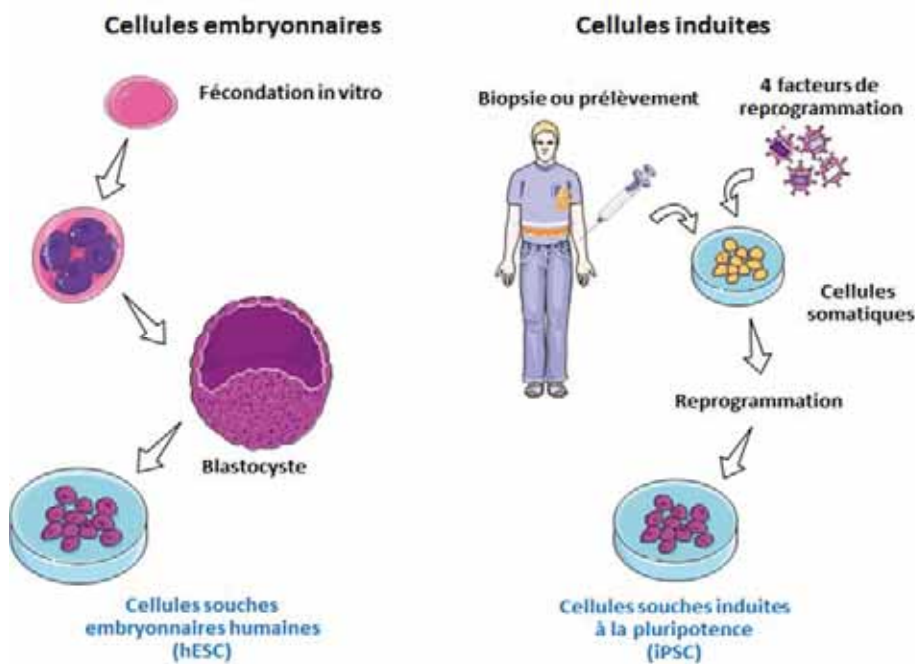


Figure 2 : Origine des différentes cellules souches pluripotentes humaines (Iconographie Istem.eu).

Au cours de mes travaux de recherche, j'ai largement privilégié les hESC notamment lorsqu'il s'est agi de diriger la différenciation des cellules pluripotentes vers un lignage neurone donné puis d'étudier les acteurs moléculaires impliqués dans le contrôle de cette différenciation. De même les hESC ont été utilisées en priorité pour identifier des voies de signalisation régulant l'expression de gènes impliqués dans les TND, les iPSC ayant servi dans un second temps pour estimer l'efficacité de composés thérapeutiques candidats pour ces mêmes TND.

Si en principe, il est possible de produire n'importe quel type de circuit neuronal à l'aide des hPSC, il faut toutefois diriger finement leur différenciation en répliquant autant que faire se peut les étapes précoces de mise en place des différentes structures cérébrales au cours de l'embryogenèse humaine et donc se reporter à ce qui est connu du développement chez le mammifère, en particulier l'Homme, *in vivo*.

II-1.C- Les principales étapes du développement du système nerveux central

Formation et régionalisation du tube neural :

L'évènement fondateur de formation du système nerveux centrale intervient à la fin de la gastrulation, à la troisième semaine post-fécondation. Il s'agit de la différenciation, à partir du tissu primitif ectodermique, des cellules du neuro-épithélium formant la plaque puis le tube neural. Sous l'action des cellules du mésoderme axial formant la corde et sécrétant la protéine Noggin inhibitrice des récepteurs aux *Bone Morphogenetic Proteins (BMP)*, la partie la plus médiane de l'ectoderme s'épaissit pour former l'épithélium de la plaque neurale. La plaque neurale s'invagine progressivement, les deux bords se soulevant puis se soudant pour former le tube neural. En parallèle de ces modifications morphologiques (formation d'un épithélium serré), les cellules neuro-épithéliales lance le premier programme d'engagement vers le lignage neural caractérisé notamment par l'expression des facteurs de transcriptions Sox1 et Pax6 (**Figure 3**).

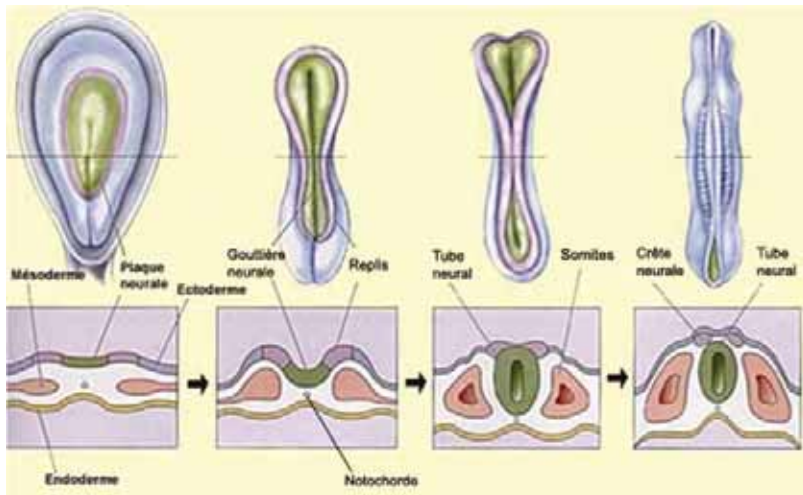


Figure 3 : La formation du tube neural chez les vertébrés (d'après Lecerveau.McGill.ca)

Dans un deuxième temps, les trois premières vésicules cérébrales, le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale, s'individualisent d'avant en arrière respectivement. Plus tard, le prosencéphale donnera naissance au télencéphale et au diencephale, le rhombencéphale au métencéphale et au myélocéphale aboutissant au final à 5 vésicules cérébrales identifiables à la fin du deuxième mois (**Figure 4**, ^[30, 31]).

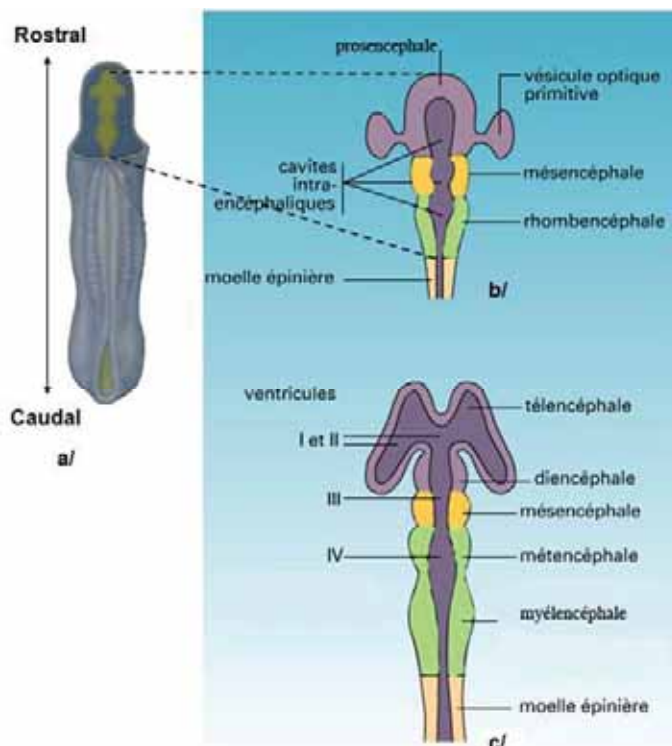


Figure 4 : Les premières étapes du développement embryonnaire du SNC chez les vertébrés (a) stade tube neural ; (b) stade trois vésicules ; (c) stade cinq vésicules (d'après access.ens-lyon.fr)

En parallèle de la régionalisation antéro-postérieure, le tube neural subit une régionalisation dorso-ventrale permettant d'établir 4 territoires du plus dorsal au plus ventral : le toit (*roofplate*), la lame alaire, la plaque basale et le plancher (*floorplate*). A partir du deuxième mois, chaque région évolue pour former les futures structures cérébrales, chacune composée de types et réseaux neuronaux distincts, interconnectées entre elles. Le télencéphale est à l'origine dorsalement des deux hémisphères corticaux et ventralement des noyaux gris centraux ou ganglions de la base (noyaux caudé et putamen, pallidum...). Le diencephale est à l'origine de l'hypothalamus, de la neurohypophyse et du thalamus. Le mésencéphale est le siège de la formation de la substance noire, de l'aire tégmentale ventrale, du noyau rouge, des noyaux oculomoteurs et d'une partie du Raphé. Le métencéphale donne dorsalement le cervelet et ventralement le pont et le bulbe. Finalement les nerfs crâniens émergent en majorité du myélocéphale [32, 33].

Au niveau cellulaire, la neurogénèse primaire s'organise aussi de manière spatiale dans chaque structure. La cavité du tube neurale est bordée par la zone ventriculaire riche en cellules prolifératives. Après une phase de divisions symétriques permettant d'établir un pool de cellules souches neurales dans la zone sub-ventriculaire, une partie des cellules issues de divisions asymétriques quittent la zone sub-ventriculaire, migre radialement vers l'extérieure, avant d'engager le processus de différenciation terminale en cellules post-mitotiques matures, notamment en neurones [34]. L'exemple du néocortex est donné à la **figure 5**. La maturation et l'intégration d'un neurone dans un réseau comprend l'individualisation du soma ou corps cellulaire, l'émission, l'arborisation et le guidage vers ses cibles des prolongements neuritiques tels que les dendrites et l'axone (neuritogenèse et guidage axonale), l'établissement de points de contact synaptiques (synaptogenèse), le renforcement ou l'élimination des synapses utiles ou inutiles respectivement (plasticité synaptique). Finalement, il existe une dimension temporelle à l'établissement des différentes populations constituant le système nerveux. Il est admis que les neurones sont formés les premiers à partir des cellules souches neurales, suivit des astrocytes puis des oligodendrocytes qui assurent la myélinisation des axones [35, 36, 37].

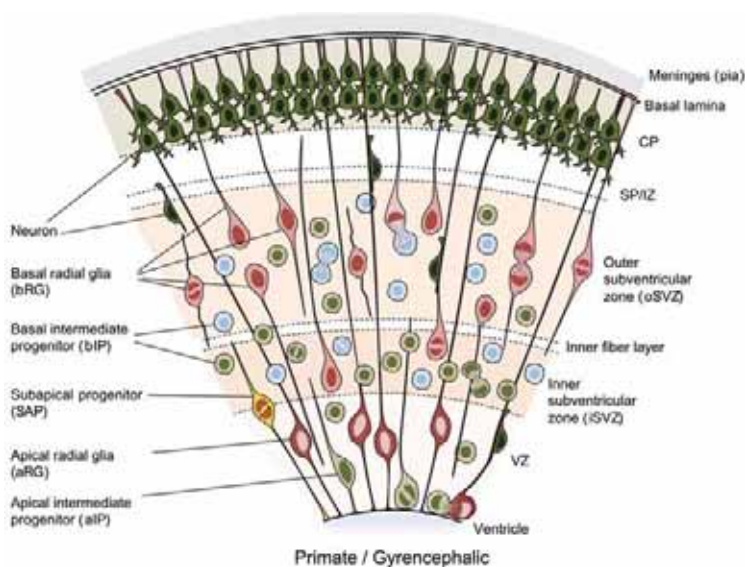


Figure 5 : Organisation spatiale de la différenciation neuronale à partir des progéniteurs de la zone ventriculaire dans le cortex en développement des primates gyrencephaliques.

La différenciation s'effectue radialement, de la zone ventriculaire profonde (ventricular zone, VZ) vers la plaque corticale superficielle (Cortical plate, CP). Elle donne lieu à la genèse de différent type de progéniteurs au potentiel graduellement restreint, distinguables sur des critères morphologiques et moléculaires (d'après [37]).

Contrôle moléculaire des processus précoces de formation et de régionalisation du tube neural :

L'action combinée de facteurs sécrétés par des centres organisateurs sous forme de gradients de concentrations conditionne la formation puis la régionalisation du tube neural, et donc l'ébauche des différentes structures cérébrales composées de différents types de neurones. Ces facteurs diffusibles agissent comme des morphogènes induisant des réponses différentes en fonction de la distance séparant les cellules réceptrices de la source émettrice. L'intégration de ces signaux contribue, via l'activation ou la répression de facteurs de transcription, à définir la position de différents groupes de progéniteurs le long des axes antéro-postérieur et dorso-ventral. Cette identité moléculaire et régionale conditionnera le type de neurones produit par ces groupes de progéniteurs.

Induction neurale

La spécification de l'ectoderme en tissu neural s'effectue très précocement, dès la gastrulation, sous l'effet des molécules noggin, chordin, follistatin et cerberus, sécrétés d'abord par l'organisateur de Spemann à la face dorsale de la gastrula puis par la chorde tout le long de l'axe longitudinal de l'embryon. L'ensemble de ces protéines a en commun d'inhiber l'activation des récepteurs aux BMP par leurs ligands naturels. Dans les cellules exposées aux BMP, la phosphorylation des récepteurs de type I et II entraîne la phosphorylation et l'activation de la protéine Smad1 permettant la formation d'un complexe avec la protéine Smad4 qui migre dans le noyau. Ce complexe actif recrute des facteurs de transcriptions comme MSX1 qui inhibent les gènes pro-neuraux. En présence des antagonistes des BMPs, les gènes pro-neuraux, notamment les gènes *SOX*, ce qui permet d'amorcer l'établissement du domaine neural à partir de l'ectoderme dorsal (**Figure 6**).

Définition de l'axe dorso-ventral

L'axe dorso-ventral est défini le plus précocement à partir de deux grandes régions ou structures organisatrices localisées sur toute la longueur axiale de l'embryon : la notochorde et les tissus ectodermiques non-neuraux. La notochorde imprime un destin ventral aux cellules du tube neural sus-jacentes via la sécrétion du morphogène sonic hedgehog (SHH), alors que les tissus ectodermiques non neurales instruisent un destin dorsal via la synthèse et la sécrétion des BMPs^[38]. Dans les cellules du tube neural, la fixation de SHH sur les récepteurs PTCH1 permet de lever l'inhibition de la protéine transmembranaire SMO et de libérer les protéines GLIs. Ces dernières migrent dans le noyau pour activer ou réprimer différents programmes génétiques (**Figure 6**,^[39]). Cette activité de sécrétion de SHH sera prise en charge dans un second temps par les cellules du plancher du tube neural qui agiront comme un nouvel organisateur^[40].

Les protéines de la famille des BMPs sont synthétisées par les tissus ectodermiques non neurales dans la partie dorsale de l'embryon. Elles antagonisent l'action de SHH et spécifient par défaut les destins dorsaux^[41]. Dans un second temps, les cellules du toit prendront le relais en tant qu'organisateur secondaire. Les protéines BMPs agissent via la phosphorylation et la translocation des facteurs de transcription Smad1/5 tel que décrit précédemment. Cette organisation « grossière » est affinée par des organisateurs régionaux dits secondaires, notamment par le mésoderme somitique qui synthétise l'acide rétinoïque (RA) qui agit directement sur la transcription via la liaison à son récepteur nucléaire. Ceci permet de spécifier les destins intermédiaires^[40, 42]. L'intégration de ses signaux au niveau cellulaire contribue à l'activation de gènes « maitres » qui marque une localisation tel que PAX6 au dorsalement ou FOXA2 dans les cellules du plancher. Ces gènes maitres et les réseaux de gènes

associés sécurise cette décision via l'activation de boucles de rétrocontrôles sur les morphogènes directement.

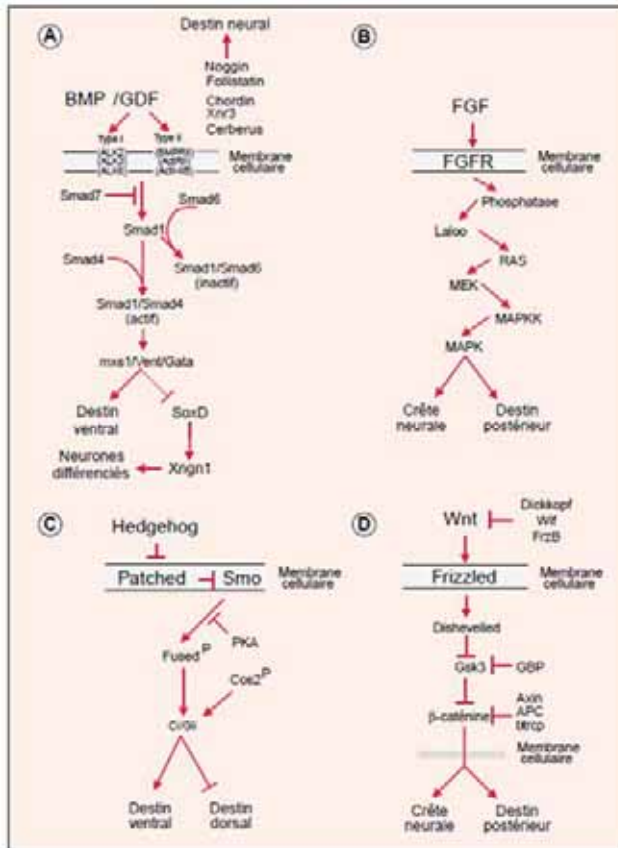


Figure 6 : Les différentes voies de signalisation activées par les principaux morphogènes impliqués dans le développement du système nerveux central.

A- Voie des protéines SMAD activée par les BMPs. B- Signalisation intracellulaire activée par les FGFs, en particulier le FGF-8. C- Voie de signalisation activée par la liaison de Sonic Hedgehog à son récepteur Patched. D- Voie canonique activée par les Wnts (D'après Hemmati-Brivanlou, Médecine Science, 2000).

Définition de l'axe antéro-postérieur

L'axe antéro-postérieur est spécifié dans un deuxième temps à partir d'organiseurs secondaires plus discrets répartis le long du tube neural. La bordure neurale antérieure (*Anterior Neural Border, ANB*), située à l'avant du prosencéphale, synthétise le FGF-8 et les antagonistes de la voie de signalisation Wnt tel que Dkk1 et imprime un destin antérieur aux cellules du tube neural adjacente (**Figure 6**). Le deuxième centre organisateurs, l'Isthme, est situé à la jonction entre le mésencéphale et le rhombencéphale (*Isthmus, Midbrain Hindbrain Boundary, MHB*) et contrôle la mise en place des 2 structures via la sécrétion de Wnt et de FGF-8. La synthèse locale d'un gradient d'acide rétinoïque contribue à la régionalisation des rhombomères du rhombencéphale ^[38, 43]. L'intégration de ses signaux permet l'activation des protéines clés dans l'obtention de l'identité de chaque région tel que FOXG1 pour le télencéphale, OTX2 en avant du MHB, GBX2 pour le métencéphale ou les facteurs HOX pour le cerveau postérieur et la moelle épinière (**Figure 7**).

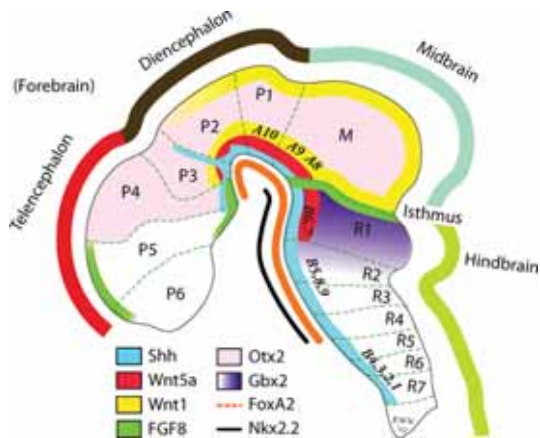


Figure 7 : Régionalisation du cerveau foetal par les centres organisateurs.

P : territoires dérivant du procencéphale, M : mésencéphale, R : rhombomères du rhombencéphale.

D'après ^[43]

Principe de la différenciation dans les différents lignages neuraux à partir des cellules souches pluripotentes

Afin d'obtenir les différents types cellulaires et reproduire la diversité neuronale à partir des cellules pluripotentes humaines, les principes fondamentaux du développement du système nerveux décrit *in vivo* chez tentent d'être reproduit. La première étape consiste à induire l'entrée restreinte dans le lignage ectodermique puis neurale afin d'obtenir les cellules neuroépithéliales. Les cellules sont ensuite exposées à différentes combinaisons et concentrations de morphogènes en suivant différentes séquences temporelles afin de les régionaliser et d'obtenir de la manière la plus efficace possible des progéniteurs spécifiques d'un ou de plusieurs sous types neuronaux. La différenciation des progéniteurs en neurones ou en cellules gliales est finalement induit en bloquant les capacités d'autorenouveau des progéniteurs, notamment à l'aide d'inhibiteurs des γ -sécrétases (**Figure 8**, [44, 45])

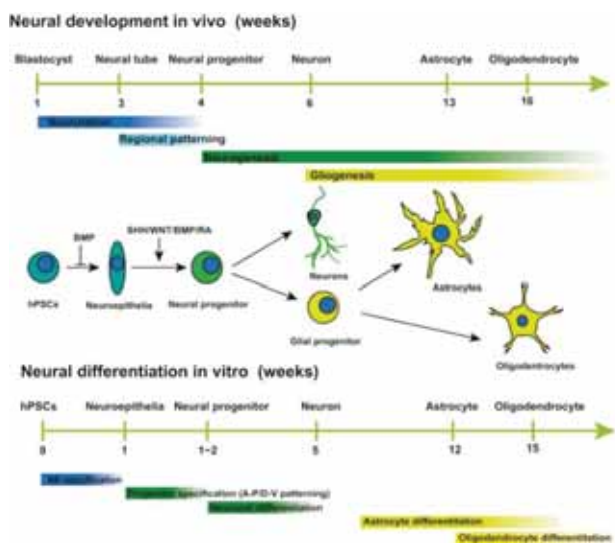


Figure 8 : Résumé des principes gouvernant la formation du système nerveux central et leur adaptation aux protocoles de différenciation des CSP ^[45]

II-1. D- La recherche de modificateurs de la neurogénèse à haut débit et ces contraintes

Les différentes propriétés des CSP et de leurs dérivés permettent d'envisager la recherche de facteur influençant la neurogénèse par criblage aléatoire à haut débit. La technique du criblage à haut débit consiste à tester l'action d'un grand nombre de molécules sur un type cellulaire d'intérêt en se basant sur les modifications de biomarqueurs pertinents sans préjuger de leur mode d'action. Ces biomarqueurs peuvent être moléculaires (activité enzymatique, expression d'un ARN ou d'une protéine, interactions de deux partenaires, ...) ou phénotypiques (morphologie cellulaire, prolifération, apoptose, ...). Le passage au haut débit implique la miniaturisation des tests dans des plaques d'au minimum 384 puits, l'automatisation des ensemencements et des traitements par les agents à tester, l'adaptation de la lecture du ou des biomarqueurs sur des imageurs permettant l'acquisition et le traitement de données à haut débit et à haut contenu.

Dans les travaux de recherche décrit ci-après, l'approche à haut débit couplée à l'utilisation de CSP saines a été utilisée pour rechercher des voies de signalisation impliquées dans la neurogenèse physiologique et pouvant servir de cible thérapeutiques dans des pathologies tel que la dépression. Lorsque cette approche a été couplée à des CSP dérivées d'individus cliniquement atteint de TND, elle a servi à identifier directement des molécules pharmacologiques prometteuses pour les malades.

II-2 : L'ACTIVATION DES MICRO-RNAS DE LA FAMILLE DE MIR-125 EST NECESSAIRE A UN ENGAGEMENT PRECOCE EFFICACE DES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES HUMAINES VERS LE LIGNAGE NEURAL

MiR-125 potentiates early neural specification of human embryonic stem cells.

Boissart C, Nissan X, Giraud-Triboult K, Peschanski M, Benchoua A.

Development. 2012. [12]

CONTEXTE DE L'ETUDE :

La capacité théorique des cellules souches pluripotentes à produire différents types de cellules du système nerveux central tel les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes, offre la possibilité d'obtenir une ressource biologique pertinente pour étudier les mécanismes moléculaires qui contrôlent l'engagement de ces cellules vers un lignage plutôt qu'un autre aux étapes les plus précoces du développement embryonnaire. Dans cette étude, j'ai choisi de poursuivre des travaux entamés en post-doctorat sur les mécanismes gouvernant la transition phénotypique qui permet l'entrée synchronisée des cellules pluripotentes dans le lignage neural. Avec le Dr Sally Lowell à Edimbourg, nous avons montré le rôle clé de la protéine Notch chez la souris et dans les cellules humaines^[8]. Cette fois-ci, j'ai cherché à documenter le rôle d'ARNs non-codants, les micro-RNAs dans cette prise de décision.

Les hESC peuvent en effet être différenciées *in vitro* en une population de cellules dites neuro-épithéliales (NEP), qui expriment les principaux marqueurs précoces du tube neural, comme PAX6 et SOX1, et s'organisent en structures en forme de rosettes constituées de cellules polarisées bordant une lumière^[46, 47]. Dans un système de culture minimal sans sérum, le N2B27, les hESC se différencient principalement mais de manière asynchrone en NEP^[8, 48]. Une partie des cellules restent indifférenciée, une autre s'engage vers d'autres lignages comme les crêtes neurales ou l'épiderme. Chambers et collaborateurs^[49] ont montré que l'inhibition des deux voies dépendantes des protéines SMADs, activées par l'activine d'une part et par les BMPs d'autre part, à l'aide des molécules SB431542 et noggin respectivement, augmentait considérablement l'efficacité de cette transition phénotypique. Ceci indiquait que l'exigence d'une inhibition complète de l'activité des différents membres de la famille du TGF- β , décrite dans l'embryon de petits vertébrés, était conservée dans des cellules humaines et récapitulée dans ce système *in vitro*. La différenciation en N2B27 seule ou supplémentée en SB431542/Noggin (milieu NFS) constitue donc un système différentiel permettant d'étudier les mécanismes de régulation de la synchronisation de la transition phénotypique de la pluripotence vers le lignage neural.

Les petits ARNs non-codants de la famille des micro-RNAs ont été identifiés dans la première décennie des années 2000 comme des régulateurs clés du développement embryonnaire^[50, 51]. Les gènes codant les micro-RNAs sont tout d'abord transcrits sous la forme de précurseurs longs appelés « pri-miRNA ». Ces précurseurs sont clivés dans le noyau par un complexe formé des enzymes Drosha et DGCR8 (pour *Di George Critical Region 8*) aboutissant à la formation du « pré-miRNA ». Le pré-miRNA est un ARN double brin d'environ 70 nucléotides replié en tige-boucle imparfaite par complémentarité de base entre la première moitié et la deuxième moitié de sa séquence. Après transport du noyau vers le cytosol, le pré-miRNA est clivé par l'enzyme DICER qui hydrolyse la structure boucle pour libérer un petit ARN double-brin correspondant à un duplexe de miRNA. Seule un des brins, libérer au sein du

complexe nucléoprotéique RISC (pour *RNA-induced silencing complex*), représente la forme active du micro-RNA. Après fixation par complémentarité de base sur le messenger cible, les micro-RNAs agissent principalement en tant que répresseur traductionnel par deux mécanismes possibles, soit la dégradation du messenger cible si le complexe RISC contient la protéine Ago2, soit la répression de la traduction de ce dernier si le complexe contient la protéine Ago1. L'ensemble de ces étapes est présenté dans la **figure 9**. Dans le contexte de cette étude, les micro-RNAs représentaient donc des candidats particulièrement intéressants puisque plusieurs avaient déjà été identifiés comme facilitant certaines transitions phénotypiques en bloquant les destins cellulaires alternatifs au sein de boucles de rétroaction négatives ^[52]. Si les micro-ARN semblaient être des acteurs plausibles dans les premières étapes de la formation du système nerveux, aucun micro-ARN en particulier n'avait été montré avoir un rôle dans l'engagement neural des cellules pluripotentes en général, humaines en particulier. Les expériences *in vivo* employant l'ablation ou la surexpression de micro-ARN lors de la gastrulation et de l'engagement neural dans l'embryon étaient particulièrement difficiles à conduire et à interpréter puisqu'elles conduisaient souvent à des phénotypes dramatiques et, dans certains cas, à une létalité embryonnaire précoce. Pour des raisons éthiques évidentes, elles sont impossibles à conduire dans l'embryon humain.

Cette étude proposait donc d'évaluer le rôle de 4 micro-RNAs, miR-9, miR-124, miR-125a et miR-125b, rapportés comme largement exprimés dans le tube neural des vertébrés ^[53, 54, 55, 56], dans l'engagement neural en utilisant les cellules hESC différenciées à l'aide du N2B27 avec ou sans les molécules inhibitrice des SMADs.

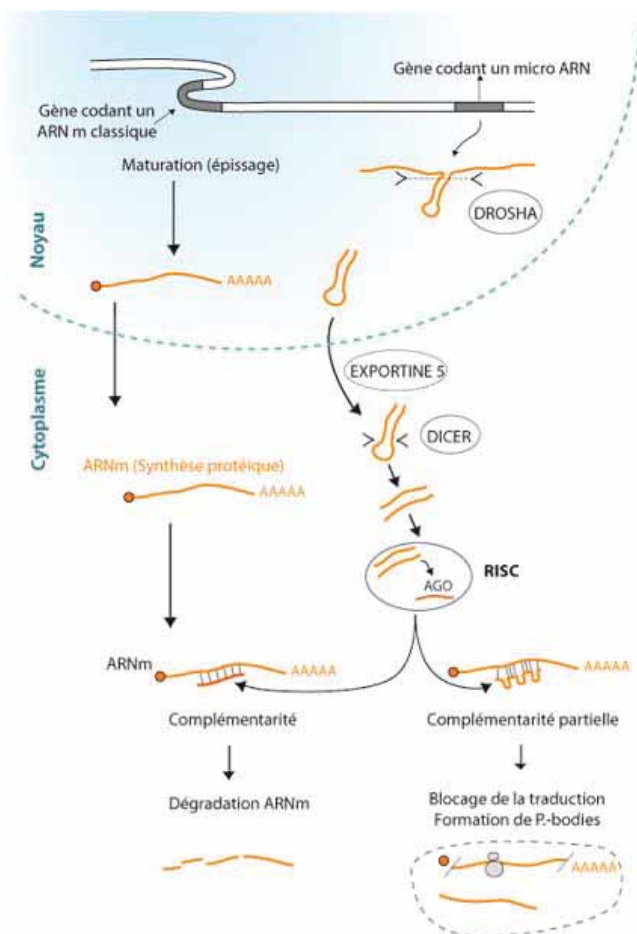
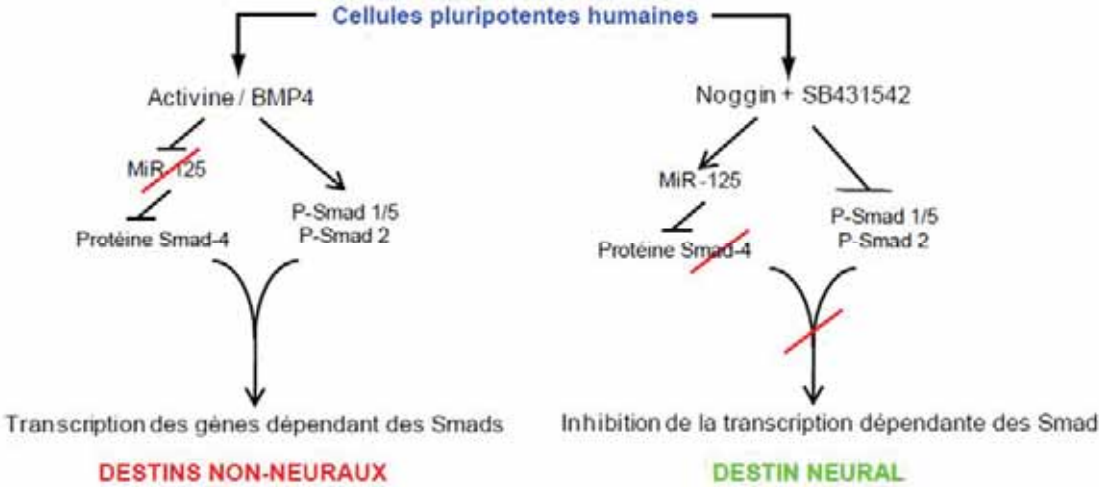


Figure 9 : Synthèse et mode d'action des micro-RNAs (d'après <https://www.virologie-uclouvain.be>)

POINTS CLES :

- Des cellules souches embryonnaires humaines ont été utilisées pour étudier le rôle d'un groupe de micro-RNAs exprimés dans le tube neural (miR-9, miR-124, miR-125a et miR-125b) dans la transition phénotypique menant de l'état pluripotent vers l'acquisition d'un destin plus restreint de cellule neuroépithéliales
- L'induction de la différenciation neurale a été induite en bloquant conjointement les voies dépendantes du TGF-beta, à l'aide de la molécule SB431542, et des BMPs, à l'aide de la protéine recombinante noggin, dans un milieu défini sans sérum (N2B27)
- Parmi les formes actives des micro-RNAs quantifiées au cours du temps après l'induction de la différenciation, seul les deux mir-125a et mir-125b sont produits massivement avec un décalage temporel compatible avec un rôle dans la transition phénotypique puisqu'ils sont les seuls à apparaître avant l'expression des marqueurs du lignage neurale PAX6 et SOX1 et conjointement à la disparition des marqueurs de pluripotence comme OCT-4 (Article Figure 1)
- La présence des deux micro-RNAs facilite l'engagement rapide et synchronisé des cellules pluripotentes dans le lignage neural mais n'est pas suffisante pour induire seule la transition si les facteurs supportant l'autorenouveau sont maintenus (Article Figures 2 et 3). En présence des BMPs ou de TGF-beta, ces deux mirs sont réprimés. L'inhibition de ces deux voies permet leur activation (Article Figure 4). Le blocage de l'expression des formes actives des deux mirs à l'aide d'oligonucléotides antago-mirs lorsque l'induction est réalisée en présence de SB431542 et noggin, conduit à la persistance de cellules indifférenciées ainsi qu'à l'engagement d'une partie des cellules dans d'autres lignages tel que les crêtes neurales ou l'épiderme, une situation similaire à celle d'une induction menée en N2B27 seul (Article Figure 5)
- Une fois activés, les deux mirs ciblent la partie 3'UTR du message du cofacteur SMAD4 et bloquent sa traduction. En conséquence, les deux voies dépendantes des SMADs ne sont plus transduites efficacement vers le noyau. Ceci a pour effet de stopper l'expression des gènes de pluripotence et de bloquer ceux permettant l'engagement vers d'autres destins phénotypiques que le destin neural (Article Figures 6 et 7)
- **En conclusion**, nous avons mis en évidence un mécanisme d'action des micro-RNAs qui participe, en parallèle de l'inhibition de la phosphorylation des SMAD, à la sécurisation de l'engagement irréversible des cellules souches pluripotentes dans le lignage neural.

RESUME GRAPHIQUE :



II-3 : OBTENTION DE NEURONES DES COUCHES SUPERIEURES DU CORTEX A PARTIR DES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES HUMAINES EXPLOITABLES POUR LA MODELISATION DES MALADIES NEUROPSYCHIATRIQUES ET LA RECHERCHE DE MOLECULES PAR CRIBLAGE A HAUT DEBIT

Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening.

Boissart C, Poulet A, Georges P, Darville H, Julita E, Delorme R, Bourgeron T, Peschanski M, Benchoua A.

Translational Psychiatry. 2013 [13]

CONTEXTE DE L'ETUDE :

La possibilité de contrôler l'entrée des cellules pluripotentes dans le lignage neural grâce à la double inhibition des voies dépendantes des protéines SMADs ^{[12], [49]}, a offert la possibilité d'imposer une régionalisation aux cellules neuroépithéliales dans le but ultime d'obtenir des populations stables de progéniteurs spécifiques de sous-types de neurones d'intérêt. L'obtention de telles populations permettait aussi d'envisager de développer des approches de criblage à haut débit dans le but de détecter des composés potentiellement thérapeutiques dans chimiothèques. Dans cette perspective, je me suis intéressée aux neurones du cortex cérébral, et plus particulier aux neurones de couches les plus superficielles.

Les neurones corticaux sont parmi les principaux neurones impactés dans les désordres neurodéveloppementaux. Les défauts de développement les touchant peuvent affecter la différenciation et la migration des progéniteurs de ces neurones, la taille du soma neuronal, la pousse et l'arborisation neuritique ou la synaptogenèse ^[57]. De manière fondamentale chez l'Homme, ces phénotypes pathologiques affectent plus particulièrement les neurones glutamatergiques des couches superficielles du cortex (couches II à IV). Ce sous-type de neurones est une marque de l'évolution du cortex des primates et est particulièrement abondant chez l'Homme en comparaison des autres espèces. Ils sont impliqués dans l'interconnexion entre les régions corticales au sein d'un même hémisphère ^[58, 59, 60, 61] et sont considérés comme le support de l'évolution des capacités cérébrales propres à l'espèce humaine (**Figure 10**, ^[62, 63]).

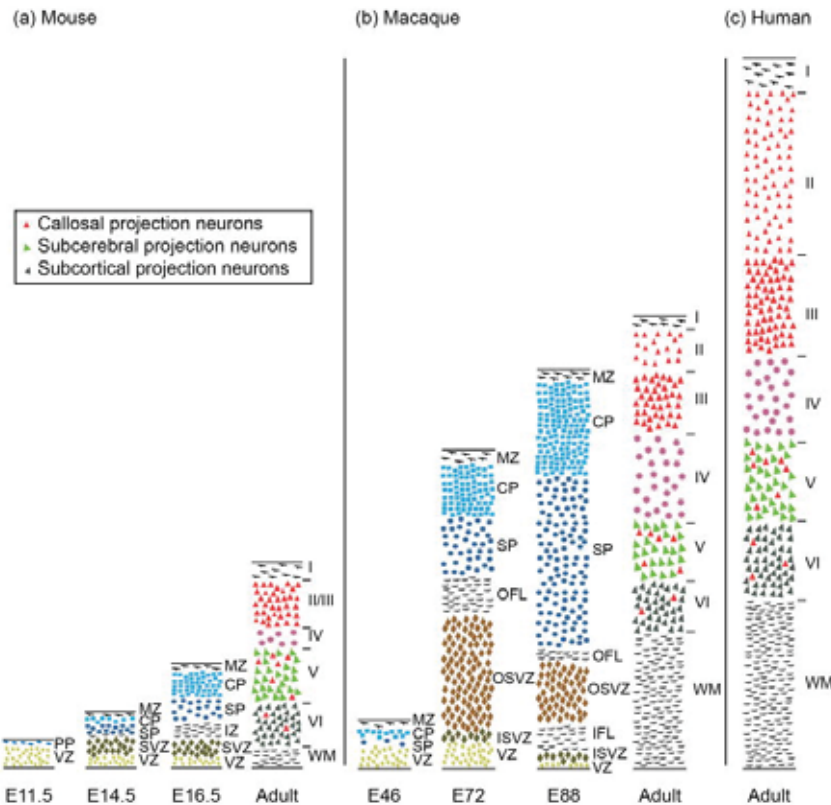


Figure 10: Comparaison des différentes couches corticales (taille et composition) entre la souris (a), le macaque (b) et l'Homme (c).

E11: âge embryonnaire post-fécondation exprimé en jours, PP : préplaque, VZ: zone ventriculaire, MZ: zone marginale, CP: plaque corticale, SVZ: zone sub-ventriculaire, IFL: couche fibreuse interne, OFL: couche fibreuse externe, SP: zone subplaquettaire, OSVZ: zone sub-ventriculaire externe, ISVZ: zone sub-ventriculaire interne, WM: substance blanche. Les chiffres romains indiquent le numéro de la couche corticale. Les neurones de projection intra-corticale (*callosal projection neurons*) sont principalement localisés dans les couches corticales superficielles II et III. D'après [64].

Par conséquent, il s'agit d'un sous-type de neurones particulièrement attrayant dans la perspective de modéliser les troubles neurologiques et psychiatriques et de rechercher des molécules potentiellement thérapeutiques pour ces affections par criblage à haut débit. Pendant l'embryogenèse, les différents sous-types de neurones associés aux différentes couches du cortex sont produits de manière séquentielle selon un patron bien défini appelé « inside-out ». Les neurones des couches profondes (VI et V) sont produits en premier puis les couches se succèdent dans l'ordre suivant : couche IV, III, II et I. Les couches les plus superficielles sont donc formées en dernier, après plusieurs cycles de divisions asymétriques des progéniteurs des zones ventriculaire et subventriculaire (*Ventricular Zone, VZ* et *SubVentricular Zone SVZ*, (Figure 11,^[65, 66]).

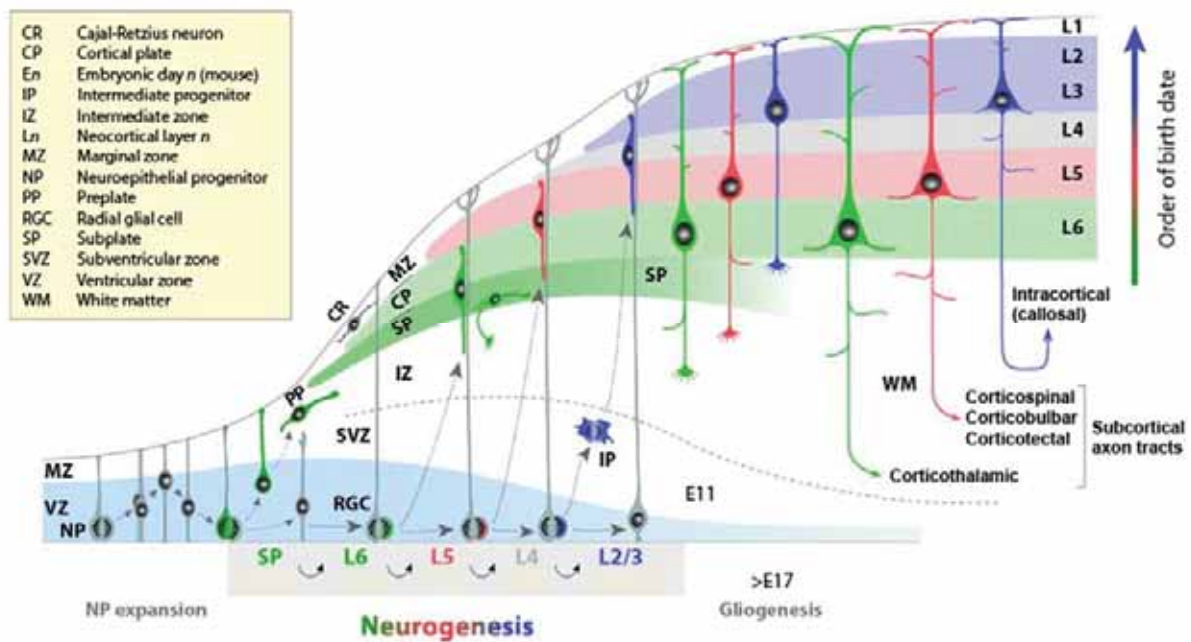


Figure 11 : Formation des couches corticales d'après le principe « inside-out » telle que décrite chez le rongeur et transposable à l'Homme. D'après [67].

Chez les rongeurs, les progéniteurs sont confinés strictement à la VZ et à la SVZ, la distinction entre les deux zones étant souvent arbitraire. Chez les primates, la VZ donne naissance aux couches corticales plus profondes dont les neurones établissent des connexions avec des structures cérébrales extra-corticales. La SVZ est à l'origine des couches corticales superficielles dont les neurones établissent les connexions intra-corticales. L'épaississement de cette zone, résultant d'une période de réplication prolongée des progéniteurs, aboutit chez les primates à la formation d'une zone externe supplémentaire appelée la zone subventriculaire externe (*outer SubVentricular Zone, oSVZ*). Cette zone est particulièrement épaisse chez l'Homme et constituée de progéniteurs ayant certaines caractéristiques de la glie radiaire tel que l'expression de nestine et de SOX2 dans des cellules unipolaires [68].

Cette séquence temporelle est récapitulée lorsque des cellules souches pluripotentes sont différenciées à l'aide de différentes techniques d'agrégation ou sous forme d'organoïdes [69, 70]. Après la phase d'induction neurale, les progéniteurs formés produisent séquentiellement les différents types de neurones corticaux, y compris ceux des couches supérieures caractérisés par l'expression des marqueurs CUX1, CUX2 et BRN2 (**Figure 12**). S'ils prouvent le potentiel des cellules pluripotentes et indiquent le respect des aspects fondamentaux de la corticogenèse *in vitro*, l'utilisation directe de ces protocoles dans le but d'étudier de manière systématique les événements cellulaires liés aux maladies neuropsychiatriques ainsi que dans la perspective du criblage de molécules à haut débit est très limitée.

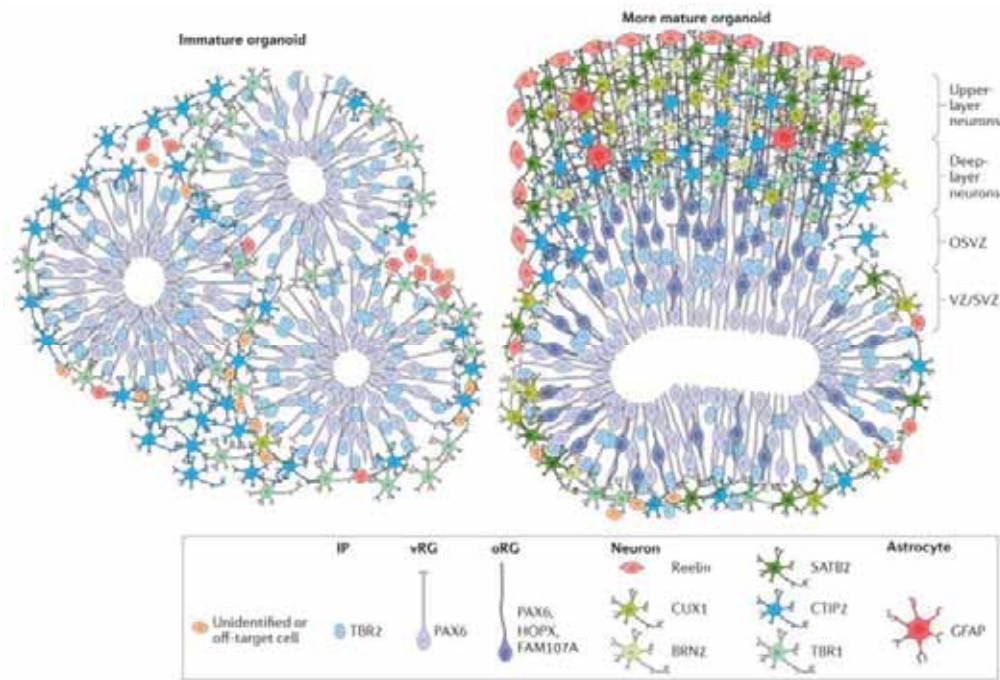


Figure 12 : Représentation schématisques des différents types cellulaires retrouvés dans les organoïdes corticaux différenciés à partir de cellules pluripotentes humaines avec les protocoles actuels.

Les organoïdes immatures contiennent principalement des cellules progénitrices organisées en structures ressemblant à des rosettes (figure de gauche). Il faut attendre plusieurs semaines pour obtenir une mixture de neurones matures des différentes couches corticales. OSVZ : zone sub-ventriculaire externe, VZ : zone ventriculaire, OSVZ : zone sub-ventriculaire, IP : progéniteurs intermédiaires, vRG : glie radiaire de la SVZ, oRG : glie radiaire de la oSVZ. D'après [71].

Les protocoles de différenciation utilisés pour la modélisation et le criblage doivent en effet être extrêmement robustes entre expériences afin de permettre de comparer la situation pathologique avec une situation contrôle ou pour pouvoir évaluer des cellules traitées ou non avec une molécule candidate. Autrement dit, le protocole doit aboutir aux mêmes types de neurones produits dans les mêmes proportions à un temps t donné, quel que soit la source de cellules pluripotentes utilisée et dans la continuité des expériences. L'ensemencement des cellules, les changements de milieu et le traitement par les molécules à tester doivent être réalisés dans un format miniature et entièrement automatisés. Enfin, les différents paramètres de neurogenèse potentiellement affectés tel que décrit ci-dessus (prolifération, différenciation des progéniteurs, taille du soma des neurones, pousse et arborisation neuritique et synaptogenèse) doivent aussi être analysables après capture automatisée à haut débit d'images de microscopie en fluorescence. La première limite des modèles 3D est donc le temps très long, généralement plusieurs semaines, avant l'obtention des neurones des couches superficielles puisque leur apparition est le résultat de l'évolution spontanée et très progressive d'un système à l'équilibre entre les progéniteurs et les neurones générés par des divisions asymétriques. De plus, ces systèmes résultent en un mélange des différentes couches corticales séquentiellement générées et ne pas permet pas la production homogène de sous-types de neurones spécifiques. Ils sont de plus peu reproductibles entre structures 3D au sein d'une expérience et entre différentes expériences. Enfin, ces protocoles étant basés sur la formation de structures multicouches tridimensionnelles compactes, très représentatives de l'organisation complexe du cortex, ceci exclut la possibilité d'utiliser un système de quantification rapide et systématique basée sur l'acquisition

d'images automatisée à haut débit Pris ensemble, même s'ils représentent des modèles de corticogenèse très pertinents d'un point de vue biologique, leur complexité et leur hétérogénéité ne les rendent pas applicables à la modélisation de pathologies neuropsychiatriques ou à la recherche de molécules thérapeutiques.

Les manipulations génétiques chez la souris ont montré que le développement du cortex peut-être biaisé pour favoriser la production des couches superficielles, notamment, en bloquant les divisions asymétriques des progéniteurs au profit de divisions symétriques afin de décaler la production ultime de neurones^[72,73]. Nous avons décidé d'appliquer une stratégie similaire en bloquant la différenciation spontanée des progéniteurs neuraux dérivés de cellules souches pluripotentes humaines à l'aide d'un cocktail de facteurs de croissance qui favorisent l'autorenouveau sans compromettre le potentiel neuronogénique des cellules. Ceci a conduit à la production d'une population homogène et stable de progéniteurs corticaux tardifs (*Late Cortical Progenitors*, LCP) qui se différencie spontanément majoritairement en neurones glutamatergiques des couches superficielles du cortex une fois le verrou de différenciation levé par retrait des facteurs de croissance. La production rapide et à la demande de neurones matures à partir de ces progéniteurs a permis le développement de tests de criblage à haut débit basés l'analyse d'images à haut contenu pour quantifier l'efficacité de différenciation des LCP et la morphologie du réseau de neurones obtenu après différenciation, en réponse à un traitement par une collection de petites molécules.

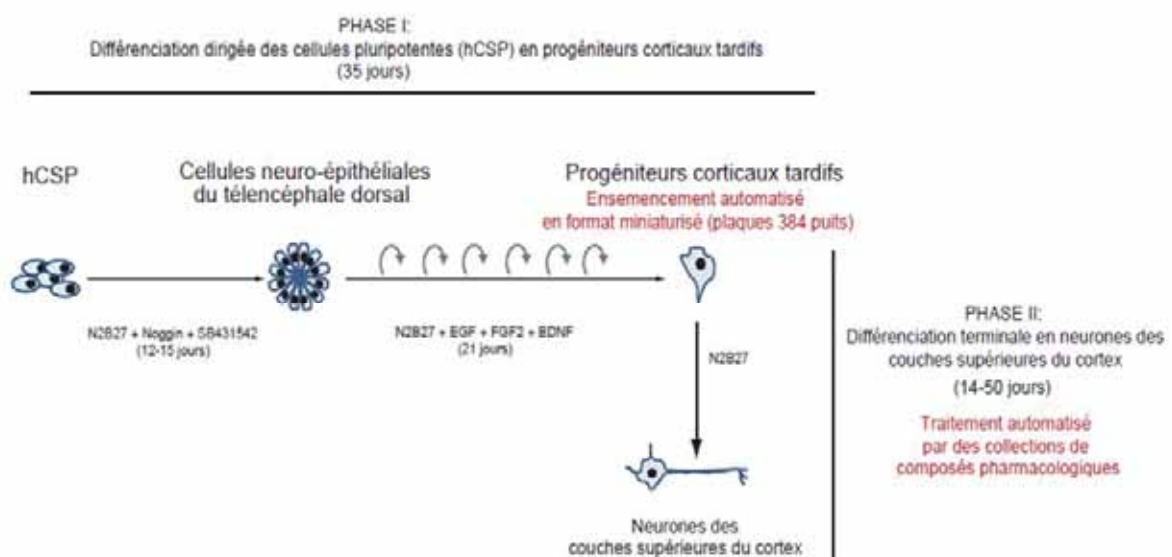
POINT CLES :

- La lignée de cellules souches embryonnaires humaines SA001 (46, XY) a été utilisée pour mettre au point un protocole permettant d'obtenir à homogénéité des neurones des couches supérieures du cortex, en respectant au mieux les mécanismes développementaux et en isolant une population de progéniteurs stables capables de s'auto-renouveler
- Les deux inhibiteurs noggin et SB4315 ont été utilisés pour permettre l'entrée dans le lignage neural et la différenciation en cellules neuroépithéliales polarisées (rosettes). Sans autres molécules instructrices, ces cellules adoptent un destin antérieur et dorsal signé par l'expression de 2 marqueurs régionaux du télencéphale dorsal EMX2 et OTX1 (Article Figure 1), une première étape vers la formation du cortex cérébral.
- Après transfert dans un milieu contenant les facteurs de croissances EGF (*Epidermal Growth Factor*), FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor-2*) et BDNF (*Brain-derived Growth Factor*), ces cellules se divisent et effectuent des changements phénotypiques progressifs rappelant le développement cortical. La perte de l'organisation en épithélium serré ainsi que la perte de l'expression de ZO-1 signe le passage de l'état cellules souches neurales de la zone ventriculaire à l'état de glie radiaire, caractérisé par le maintien, dans des cellules migrantes, de l'expression de PAX6 et de SOX2 et l'acquisition de Blbp. Après plusieurs divisions, l'analyse morphologique et transcriptomique des progéniteurs neuraux obtenus suggère l'acquisition d'un phénotype stable correspondant aux cellules de la zone subventriculaires externe (oSVZ) Nous les avons donc nommés progéniteurs corticaux tardifs (*Late Cortical Progenitors*, LCP) (Article Figure 1).
- Afin de tester le potentiel de différenciation neuronal des LCP, ces derniers ont été ensemencés à basse densité en absence des facteurs supportant leur prolifération (retrait des facteurs

EGF, FGF-2 et BDNF). Après 21 jours, environ 70% des cellules en culture expriment les marqueurs neuronaux HuC/D et Tuj-1 (beta-III tubuline). Ces neurones sont majoritairement glutamatergiques (80%) et GABAergiques (10%). L'analyse des marqueurs moléculaires des différentes couches du cortex indique une majorité de neurones exprimant trois marqueurs des couches supérieures BRN2, CUX1 et CUX2 (couches II à IV, 70%). Une faible proportion exprime le marqueur des couches plus profondes CTIP2 (couches V et VI). Ces analyses d'immunofluorescence ont été confirmées et complétées par une approche d'expression de gènes par qPCR et validées par rapport au cerveau fœtal (Article Figure 2).

- La différenciation des LCP en neurones (21 jours) a été adaptée aux contraintes du criblage à haut débit en débutant par la miniaturisation en plaques 384 puits. L'ensemencement et les changements de milieu ont été totalement automatisés. Un ensemble d'algorithmes d'analyse d'images a été développé afin de pouvoir mener des analyses à haut débit et à haut contenu du phénotype des cellules ainsi que de leur état morphologique et fonctionnel. Un criblage pilote a été réalisé correspondant au traitement et à l'analyse multiparamétrique de plus de 1000 puits en parallèle. Ceci a permis d'identifier des molécules modifiant le taux de différenciation des LCP en neurones ou modifiant l'organisation du réseau de neurones (Article Figures 3 et 4)
- Finalement, des LCP et des neurones corticaux ont été obtenus à partir de 4 lignées de cellules souches induites à la pluripotence : 2 dérivées d'individus sains et 2 d'individus avec troubles du spectre autistiques (Article Figure 5)
- **En conclusion**, nous avons utilisé différentes sources de cellules souches pluripotentes humaines pour mettre au point un modèle biologiquement pertinent de neurones des couches superficielles du cortex utilisable pour la recherche de molécules thérapeutiques à haut débit pour les maladies neuropsychiatriques.

RESUME GRAPHIQUE



II-4 : L'INHIBITION DE LA PROTEINE KINASE A (PKA) EST SUFFISANTE POUR PERMETTRE L'AUTORENOUVELEMENT DES CELLULES SOUCHES NEURALES HUMAINES

Protein Kinase-A Inhibition Is Sufficient to Support Human Neural Stem Cells Self-Renewal

Georges P, Boissart C, Poulet A, Peschanski M, Benchoua A.

Stem Cells. 2015 [14]

CONTEXTE DE L'ETUDE :

D'un point de vue pratique, les cellules souches neurales dérivées de cellules souches pluripotentes (hNSC) représentent une ressource unique de neurones humains pour diverses applications biomédicales incluant la thérapie cellulaire de remplacement, la modélisation des maladies neurologiques et psychiatriques ou la recherche de molécules thérapeutiques. D'un point de vue plus fondamental, elles permettent de mieux comprendre *in vitro* la biologie de ces cellules rencontrées durant la neurogenèse embryonnaire ou résidant dans de discrètes zones du cerveau adulte ([20]). Dans cette étude, nous avons décidé d'utiliser les NSC décrites en 2013 ([12]) et l'approche de criblage à haut débit pour identifier sans *a priori* des modulateurs de l'autorenouveauement de ces cellules et révéler des voies de signalisation gouvernant la balance autorenouveauement /différenciation. En plus de l'intérêt fondamental d'une meilleure compréhension de ces cellules, l'identification de petites molécules supportant la prolifération des hNSC permet d'envisager de simplifier leur milieu de culture et d'amplification. Communément, celui-ci est basé principalement sur l'utilisation d'une combinaison de facteurs de croissance protéiques incluant l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), le FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor-2*) et le BDNF (*Brain-derived Growth Factor*) sur une base ne comprenant pas de sérum (N2B27, [48]) L'utilisation de la combinaison d'EGF et de FGF-2 pour cultiver les NSC adhérentes est en réalité un héritage des méthodes de culture développées pour amplifier des précurseurs isolés du cerveau embryonnaire de souris ^[74] ou humain ^[75] sous forme de sphères en suspension. L'efficacité de ce cocktail quel que soit l'origine (espèce, âge et région cérébrale prélevée) et la méthode de culture (adhérente en monocouche ou suspension sous forme de neurosphères) suggère que le contrôle de l'autorenouveauement des NSC est un mécanisme complexe impliquant plusieurs voies de transduction dépendantes notamment des protéines kinases. En effet, l'EGF et le FGF-2 activent de nombreuses voies dépendantes des kinases comme les voies PKC (via la PLC), PKB/Akt ou Ras/Raf/MEK/MAPK ^[76, 77]. Cette activation massive de plusieurs cascades de phosphorylation aboutie à la mise en jeu de nombreux effecteurs, notamment des facteurs de transcription. Il est donc très difficile de savoir quelles sont les voies et effecteurs réellement essentiels au maintien de l'autorenouveauement des hNSC.

Le criblage à haut débit de petites molécules, en permettant de comparer en parallèle le potentiel de plusieurs centaines de composés, peut apporter de nouveaux éléments concernant l'implication des kinases dans la régulation de l'autorenouveauement des hNSC. Dans cette étude, nous avons choisi d'interroger une collection de 80 modulateurs de kinases (collection ENZOKinase, Enzolive Sciences, France) pour sa capacité à maintenir en prolifération des hNSC issues de la lignée de hESC SA001, tout en conservant leur potentiel neuronogénique. Nous avons démontré qu'en présence d'EGF, FGF-2 et BDNF, la population de cellules exprime de manière homogène le marqueur SOX2 (hNSC non différenciée) et que plus de 50% expriment le marqueur de prolifération Ki67. Le retrait des facteurs de croissance du milieu entraîne la différenciation progressive de ces cellules en neurones post-

mitotiques qui expriment le marqueur HuC/D mais plus SOX2 ou Ki67. Ce phénomène peut être quantifié par une approche d'imagerie à haut débit et haut contenu en mesurant, après 7 jours de retrait des facteurs, le ratio entre les cellules co-exprimant SOX2 et ki67 par rapport aux cellules exprimant le marqueur neuronal HuC/D ^[13]. Nous avons donc exposé les hNSC pendant 7 jours à la collection de modulateurs de kinases après retrait des facteurs de croissance et recherché ceux contribuant au maintien d'un taux de cellules SOX2/Ki67 élevé.

Cette approche a permis de mettre en évidence que l'inhibition d'une seule kinase, la PKA était suffisante pour supporter l'autorenouveau des hNSC à long terme tout en préservant leur capacité à produire des neurones post-mitotiques.

POINT CLES :

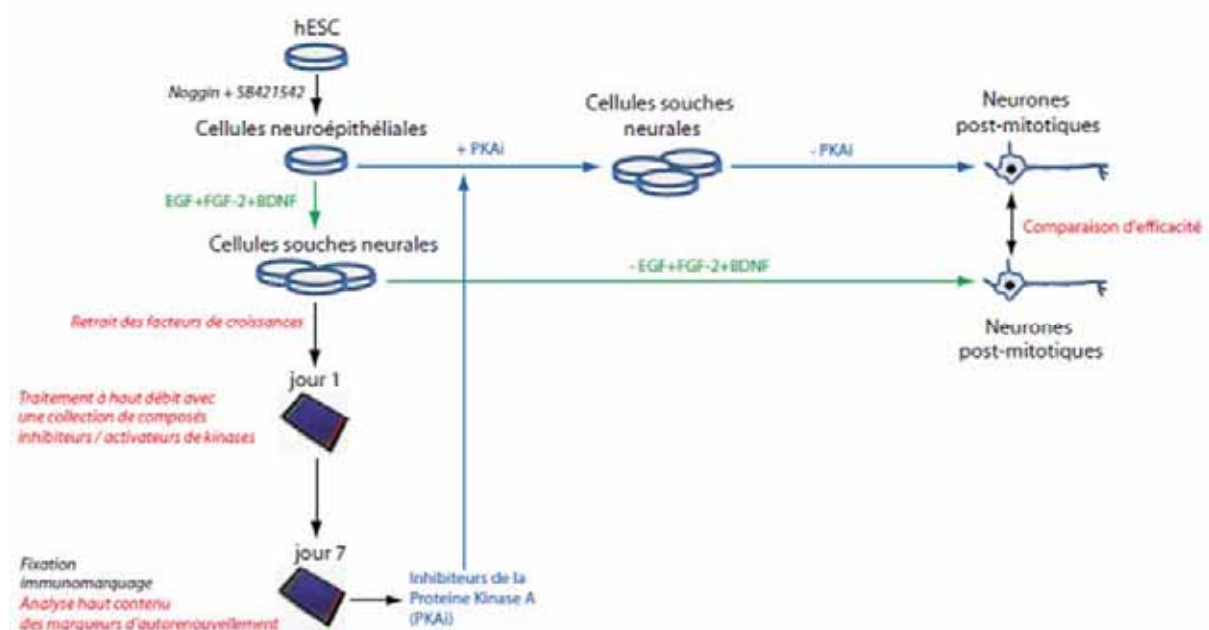
- Les cellules souches neurales (NSC) différenciées à partir de la lignée de cellules souches embryonnaire humaine SA001 (46, XY) selon le protocole décrit dans ^[13] ont été utilisées pour identifier parmi une collection de 80 modulateurs chimiques de l'activité des protéines kinases ceux capables de promouvoir la multiplication des NSC en l'absence des facteurs de croissance EGF, FGF-2 et BDNF (milieu EFB). Pour cela, une approche de criblage à haut débit a été utilisée.
- Les NSC ont été ensemencées dans des plaques 384 puits dans un milieu sans sérum et sans facteurs de croissance (N2B27) et traitées avec la collection de modulateurs pendant 7 jours. Chaque molécule a été testée à deux concentrations et en quadruplicats (soit un total de 640 puits en parallèle). Au bout de 7 jours, le pourcentage de cellules co-exprimant SOX2 et Ki67 a été mesuré par une approche d'imagerie haut contenu et haut débit.
- Ce criblage primaire a permis d'identifier 8 composés qui augmentent de plus de 50% le pourcentage de cellules co-exprimant SOX2 et Ki67, et ce aux deux concentrations testées. Parmi ces 8 molécules, les composés HA-1004, H8, H7, HA1077 et H9 ont en commun d'appartenir à la famille des 5-isoquinolinesulfonamides, décrit comme des inhibiteurs de la Protéine Kinase A et de la Protéine Kinase G (PKA et PKG, Article Figure 1).
- Afin de préciser le mécanisme d'action de ces molécules, les NSC ont été traitées pendant 7 jours avec un activateur de la PKA (8-chloroadenosine 3', 5'-cyclic-mono-phosphate) ou un activateur de la PKG (8-(4-chlorophenylthio-) guanosine 3', 5'-cyclic-mono-phosphate), puis le pourcentage de cellules SOX2/Ki67 mesuré. Ceci a montré que l'activation spécifique de la PKA induisait une diminution significative du pourcentage de NSC en prolifération. Cet effet n'a pas été retrouvé lors de l'activation de la PKG. Afin de confirmer l'implication de la PKA, une expérience miroir a été réalisée. Les NSC ont été transfectées avec un vecteur permettant l'expression de 3 shRNA différents bloquant la traduction de l'ARNm de la PKA, d'un shRNA ne ciblant aucun messenger ou bien le vecteur vide. L'expression des shRNA bloquant l'expression de PKA a eu pour conséquence d'augmenter très significativement la prolifération des NSC indifférenciées confirmant le rôle prépondérant de l'inhibition de la PKA dans le mode d'action des composés de la famille des 5-isoquinolinesulfonamides (Article Figure 2).
- Dans un second temps, le potentiel des 5-isoquinolinesulfonamides à supporter la dérivation et la culture à long terme des NSC en l'absence d'autres facteurs de croissance a été testé. Des cellules neuroépithéliales différenciées à partir des hESC SA001 par inhibition des voies SMAD ont été

directement transférées dans le milieu EFB ou dans un milieu ne contenant que l'inhibiteur HA1004 en remplacement des facteurs FGF-2, EGF et BDNF (milieu PKAi). Après 8 passages, le phénotype des NSC obtenues a été comparé en analysant le transcriptome de ces cellules puis en quantifiant l'expression des marqueurs SOX2, nestine et PAX6 en immunofluorescence. Les cellules obtenues dans les deux conditions ont un profil d'expression génique similaire ainsi que des morphologies et expressions des marqueurs de NSC identiques. Lorsque placées dans des conditions permettant la différenciation terminale en neurones, les NSC obtenues dans les deux conditions produisent des taux similaires de neurones ayant une signature corticale (Article Figure 3). En conclusion, l'inhibition de la PKA par le HA1004 est suffisante pour permettre la dérivation et l'amplification des NSC en l'absence de tout autre facteur de croissance.

➤ Afin d'exclure un effet lignée spécifique et donc de tester la robustesse de l'action de l'inhibition de la PKA sur l'autorenouveauement des NSC, le protocole a été reproduit sur une autre lignée hESC issu d'un embryon femelle (H9) et sur 3 lignées de cellules induites à la pluripotence dérivées de fibroblastes de 2 hommes (1869 et 4603) ou de cellules polynucléaires sanguines d'une femme (PB12). Des NSC prolifératives exprimant les marqueurs SOX2 et nestine ont été obtenues pour les 4 lignées, présentant toute un potentiel de différenciation neuronale identique (Article Figure 4).

➤ **En conclusion**, nous avons mis en évidence le rôle central de l'activité de la PKA dans la régulation de l'autorenouveauement des NSC dérivées de hPSC. L'identification de ce rôle a été rendu possible grâce à l'utilisation d'une approche à haut débit permettant de comparer plus de 80 modulateurs d'activité de kinases en parallèle. Cette approche pourrait être étendu à d'autres types de régulateurs cellulaires afin d'accroître les connaissances sur les modalités de contrôle du potentiel des NSC et d'optimiser leurs conditions de culture et de différenciation.

RESUME GRAPHIQUE



II-5 : UTILISATION DES NEURONES DERIVES DES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES POUR L'IDENTIFICATION A HAUT DEBIT DE MOLECULES D'INTERET THERAPEUTIQUE POUR LES TROUBLES DU SPECTRE AUTISTIQUES : EXEMPLE DU SYNDROME DE L'HAPLOINSUFFISANCE DU GENE SHANK3.

Human Pluripotent Stem Cell-derived Cortical Neurons for High Throughput Medication Screening in Autism: A Proof of Concept Study in SHANK3 Haploinsufficiency Syndrome.

Darville H, Poulet A, Rodet-Amsellem F, Chatrousse L, Pernelle J, Boissart C, Héron D, Nava C, Perrier A, Jarrige M, Cogé F, Millan MJ, Bourgeron T, Peschanski M, Delorme R, Bouchou A. EBioMedicine. 2016 [16]

CONTEXTE DE L'ETUDE :

Les troubles du spectre autistique (TSA) représentent un groupe hétérogène de désordres neurodéveloppementaux qui touchent environ 1 à 2% de la population des pays industrialisés. Apparaissant avant l'âge de 3 ans, ils se caractérisent par des atteintes dans trois sphères du développement de l'enfant: les interactions sociales, la communication verbale et non verbale, et les centres d'intérêts et comportements (restreints, atypiques, répétitifs ou stéréotypés). Les symptômes représentent un continuum qui varie de léger à sévère, et le niveau de fonctionnement varie d'une personne à l'autre [78]. A l'heure actuelle, la prise en charge des TSA repose principalement sur une approche comportementale. Les traitements pharmacologiques restent symptomatiques et visent principalement à contrôler les différentes comorbidités [79, 80]. De nombreux obstacles s'opposent au développement de thérapies efficaces pour les TSA, notamment la compréhension encore limitée de leur étiologie, l'hétérogénéité des symptômes ainsi que l'aspect multifactoriel de leur émergence. Il est de plus extrêmement compliqué de les modéliser expérimentalement.

Dans environ un tiers des cas, une cause génétique a été clairement identifiée. L'étude de ces formes génétiques a permis d'émettre l'hypothèse que l'ensemble des mécanismes contrôlant la balance Excitation/Inhibition de la transmission synaptique (balance E/I) pourrait être un point de convergence permettant d'envisager une intervention thérapeutique, en particulier une intervention pharmacologique [81, 82, 83]. Toutefois, la façon dont cette balance est impactée est elle-même très hétérogène en fonction du gène touché pouvant aller d'un extrême à l'autre. En effet, le même ensemble de symptômes peut être la résultante, chez l'animal modèle en tout cas, d'une modification de la balance en faveur de l'excitation ou au contraire de l'inhibition [84]. Une seule stratégie pour traiter l'ensemble des TSA n'est donc pas envisageable et le succès d'une intervention pharmacologique est conditionné à la bonne stratification des malades en fonction du type de dysfonctionnement de connectivité aboutissant à l'apparition des symptômes.

L'ensemble de ces constats plaident donc pour le développement de méthodes permettant de tester de manière plus personnalisée différentes options pharmacologiques en fonction du profil génétique des malades en attente de traitement. La cible thérapeutique étant la communication synaptique, pour qu'un modèle puisse être prédictif de l'effet d'un composé pharmacologique, il doit idéalement récapituler un réseau de neurones humains fonctionnel. Les neurones corticaux différenciés à partir des cellules souches pluripotentes, en particulier des iPSC, apparaissent donc une approche séduisante. Nous avons donc souhaité faire la preuve de concept que le système décrit dans

[13] pouvait permettre d'identifier des composés ayant un intérêt thérapeutique pour des malades porteurs de mutations spécifiques responsables de troubles du comportement, en utilisant le criblage à haut débit. Afin de mettre en place une telle stratégie, nous nous sommes concentrés sur les TSA associés à la perte de fonction du gène *SHANK3*, en collaboration avec les Prs Thomas Bourgeron et Richard Delorme. Les mutations du gène *SHANK3* ont été associées aux TSA par criblage génétique de différentes cohortes de malades et apparentés où elles ont été retrouvées chez 0,69 à 2,12% des individus atteints de TSA [85, 86]. Il s'agit essentiellement de mutations apparaissant *de novo*, aboutissant à la perte de fonction d'un des deux allèles de *SHANK3* et donc à une haploinsuffisance. La protéine synaptique SHANK3 (*SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3*) est localisée au niveau de la densité post-synaptique (PSD) des synapses glutamatergiques où elle joue le rôle de protéine d'échafaudage recrutant les différents éléments post-synaptiques, tels que les récepteurs au glutamate, et les reliant au cytosquelette d'actine [87]. Ce rôle d'échafaudage contribue à la formation, la stabilisation et le renforcement des synapses glutamatergiques et augmente leur efficacité de transmission [88], **Figure 13**.

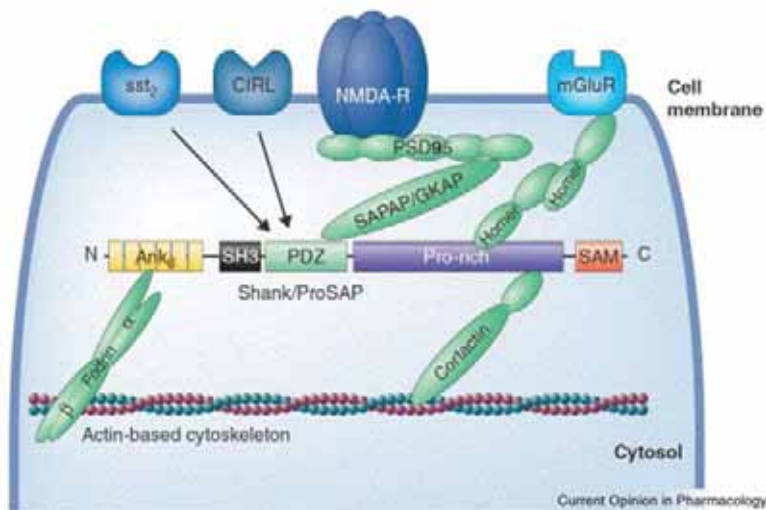


Figure 13 : Représentation schématique des différents domaines de SHANK3 et de ses différents partenaires à la synapse glutamatergique. D'après [89].

Les souris invalidées de manière homozygote pour le gène *Shank3* récapitulent certains comportements pouvant s'apparenter à des TSA, tel que l'excès de toilette. Au niveau histologique elles montrent une réduction du nombre de synapses glutamatergiques dans l'hippocampe et le striatum, ainsi qu'une perte de plasticité liée à l'expérience [82, 90]. Ces phénotypes sont réversibles si SHANK3 est réintroduit par une approche génétique et ce même si la réexpression survient après la naissance des animaux. Cet aspect réversible des phénotypes associés à l'haploinsuffisance de SHANK3 a été retrouvé dans des neurones différenciés à partir d'iPSC dérivées de malades atteints du syndrome de Phelan-McDermid, syndrome dû à la délétion d'une partie du chromosome 22 contenant, entre autre, le gène *SHANK3* [91]. L'haploinsuffisance induite par la perte d'un allèle de *SHANK3* représentait donc un modèle de TSA simple avec un effet direct du dosage de l'expression du gène sur l'apparition des phénotypes neuronaux [85, 92].

Classiquement, la prise en charge pharmacologique des malades porteurs des mutations *SHANK3* consiste en une approche symptomatologique peu satisfaisante et il n'existait pas de modèle

permettant de choisir de manière plus spécifique des composés potentiellement efficaces. Nous avons émis l'hypothèse qu'un composé remontant les niveaux d'expression de SHANK3 dans les neurones humains serait potentiellement intéressant pour réduire les troubles comportementaux des malades présentant une haploinsuffisance du gène. Nous avons utilisé les neurones corticaux différenciés à partir des hPSC combinés à la technique du criblage à haut débit pour identifier de tels composés dans une collection de 202 molécules utilisées couramment pour différentes applications en neurologie et en psychiatrie, y compris chez l'enfant, ainsi qu'une liste de composés que nous avons précédemment identifiés comme des modulateurs de la neurogénèse *in vitro* ^[13, 14]. Afin d'identifier les composés augmentant les niveaux d'ARNm de *SHANK3* dans des neurones humains après traitement, nous avons choisi de développer un essai de criblage moléculaire à haut débit basé sur une mesure en qPCR de ce messenger. Afin d'éviter un biais dû à la variabilité de l'empreinte épigénétique résiduelle persistant après la reprogrammation de cellules somatiques en iPSC, le développement de l'essai ainsi que le criblage primaire ont été réalisés sur des neurones corticaux différenciés à partir de la lignée de cellules souches embryonnaires SA001. Ces composés ont ensuite été testés pour leur capacité à reverser les phénotypes anormaux identifiés dans des neurones différenciés à partir d'iPSC d'individus porteurs de mutations tronquantes dans le gène *SHANK3*. Finalement, le lithium a été sélectionné afin d'être testé pendant un an sur l'un des deux patients ayant servi de donneur pour la reprogrammation des iPSC.

POINT CLES :

- Une étude en cinétique de l'expression de l'ARNm de *SHANK3* dans les neurones différenciés à partir de la lignée SA001 montre une augmentation progressive de la synthèse de ce dernier au cours de la différenciation neuronale, suivie de la synthèse et de l'incorporation de la protéine SHANK3 dans les densités post-synaptiques. Des neurones de 14 jours ont été choisis pour tester les composés sur les niveaux d'ARNm puisque c'est ce temps qui présentait la meilleure plage dynamique de modulation (Article Figure S1).
- Les 202 composés ont été testés à dose unique, sélectionnée en fonction des données de la littérature pour chaque composé, et en quadruplicat. Ce premier criblage a permis d'identifier 29 composés qui augmentaient les taux de messagers de *SHANK3* d'au moins 30% avec amplitude supérieure à 2 déviations standard (2σ) par rapport aux cellules traitées avec le DMSO seul. Après réplication de l'expérience, 22 composés ont été confirmés. Quinze composés montraient un effet sur l'ARNm de *SHANK3* proportionnel à la dose employée. Sur ces 15 composés, 6 ont été sélectionnés pour une étude plus approfondie, 5 composés possédant une AMM (Fendiline, Aripiprazol, Lithium, Valproate de sodium et Fluoxetine) ainsi que le BWB70C, qui agit sur la même cible thérapeutique du Zileuton (Article Figure 1).
- Afin de déterminer si l'augmentation de l'expression de l'ARNm de *SHANK3* induite par ces 6 composés était corrélée à un effet fonctionnel sur le réseau de neurone, les niveaux de la protéine SHANK3 ainsi que son incorporation dans les densités post-synaptiques ont été mesurés après traitement, et l'activité du réseau neuronal évaluée par imagerie des oscillations calciques spontanées (OCS). Parmi les 6 composés, le Valproate (VPA), le Lithium et la Fluoxetine augmentaient significativement la protéine SHANK3 aux doses testées, mais seuls le VPA et le lithium augmentaient sa localisation synaptique (Article Figure 2). L'analyse des OCS enregistrées dans le réseau de neurones indiquait une corrélation entre l'augmentation de l'incorporation de SHANK3 dans les synapses et

l'activité neuronale (Article Figure 3). L'ensemble de ces effets étaient atténués si les neurones étaient prétraités avec un shRNA bloquant la traduction de SHANK3 indiquant que l'effet bénéfique des composés est principalement dépendant de l'augmentation de SHANK3.

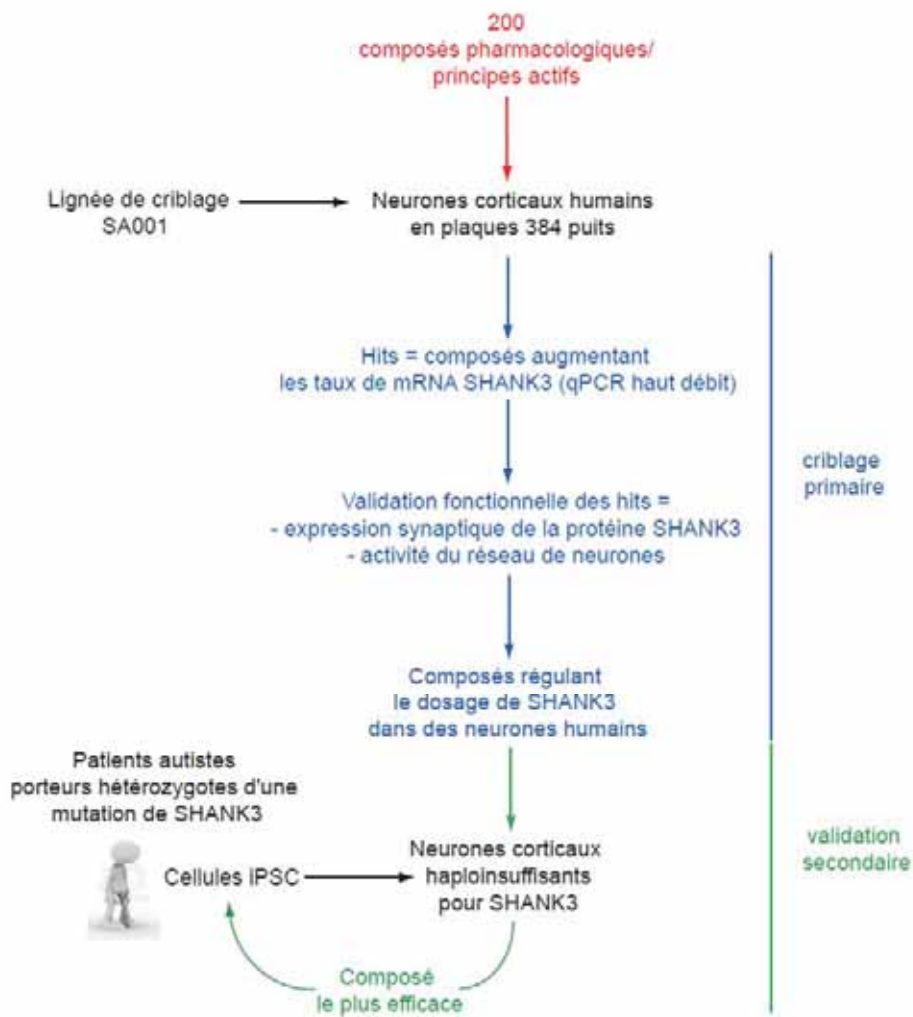
➤ Afin de documenter le mode d'action du Lithium et du VPA, le profil d'expression de 150 gènes codant pour des protéines neuronales et synaptiques a été établi après traitement. Cette analyse montrait un effet plus discret du Lithium qui modifiait principalement l'expression de gènes codant pour des protéines partenaires de SHANK3 dans la densité post-synaptique (comme HOMER2, GRM1, GRM3, GRM6 ou NR4A1, Article Figure 4). Cet effet discret a été confirmé dans une analyse plus générale du transcriptome des neurones traités au Lithium ou au VPA. Parmi les voies de signalisation communément ciblées par le VPA et le Lithium, nous avons choisi d'investiguer le rôle de l'inhibition de la GSK-3 β et de l'inhibition des histones déacétylases de type I (HDAC-I) dans la régulation de l'ARNm de SHANK3. Cette série d'expérience a démontré que l'effet du VPA et du Lithium était indépendant de l'inhibition de la GSK-3 β mais que l'inhibition des HDAC était une voie potentielle (Article Figure 4).

➤ Afin d'évaluer l'efficacité du Lithium et du VPA sur des phénotypes neuronaux associés à l'haploinsuffisance de SHANK3, des lignées d'iPSC ont été reprogrammées à partir de culture de fibroblastes de 2 enfants atteints du syndrome de Phelan-McDermid, suivis à l'hôpital Robert Debré à Paris dans le service du Pr Richard Delorme. Les deux enfants étaient porteurs de mutations tronquantes dans un des deux allèles de SHANK3 et présentaient des TSA. Des neurones corticaux ont été différenciés à partir de ces iPSC et comparés à des neurones contrôles. Les neurones porteurs des mutations présentaient un nombre réduit de synapses contenant la protéine SHANK3 et une activité neuronale réduite telle que mesurée grâce au OCS (Article Figure 6). Le traitement des neurones avec le lithium ou le VPA a augmenté à la fois le nombre de synapses contenant SHANK3 et l'activité du réseau neuronal, indiquant que ces deux composés pouvaient avoir un effet thérapeutique intéressant.

➤ Le lithium a été administré à l'un des deux enfants pendant un an et l'intensité des symptômes autistiques évalués sur 2 échelles, la SRS (*Social Responsiveness Scale*) et l'ADOS (*Autism Diagnosis Observational Scale*). Ces deux tests ont montré une diminution de la sévérité des symptômes, en particulier une amélioration significative des capacités d'interactions sociales.

➤ **En conclusion**, cette étude nous a permis d'identifier le lithium, médicament approuvé pour les troubles bipolaires, comme une molécule prometteuse pour réduire les symptômes autistiques induit par l'haploinsuffisance du gène SHANK3. Un essai clinique contre placebo sera toutefois nécessaire pour évaluer pleinement le potentiel de ce composé. Ce résultat a été obtenu sur la base d'un criblage aléatoire de composés basé sur l'analyse directe de leur effet sur l'expression de SHANK3 et des phénotypes anormaux associés à son haploinsuffisance sur des neurones dérivés de lignées de cellules souches pluripotentes. Cette nouvelle méthodologie est applicable à d'autres formes de TSA présentant des substrats physiopathologiques différents, ainsi qu'à d'autres troubles du SNC avec des anomalies moléculaires connues. En tant que telle, elle offre donc une voie à la stratification des malades en attente de traitement et, en fin de compte, représente un premier pas vers une médecine personnalisée.

RESUME GRAPHIQUE



III- Projets de recherche en cours

III-1 : LA MALADIE DE LESCH-NYHAN : IMPLICATION DE L'ENZYME HGPRT DANS LE DEVELOPPEMENT NEURONAL

La maladie de Lesch-Nyhan (MLN) est une maladie rare récessive liée à l'X d'une prévalence estimée de 1/380 000 naissances [93]. Elle est la conséquence de la perte de fonction d'une enzyme limitante du recyclage des purines, l'Hypoxanthine-Guanine-PhosphoRibosylTransférase (HGPRT). L'HGPRT est la seule enzyme connue permettant de catalyser la conversion de l'hypoxanthine en inosine monophosphate (IMP) et de la guanine en guanine monophosphate (GMP) en présence de 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (PRPP, **Figure 14**, [94, 95]).

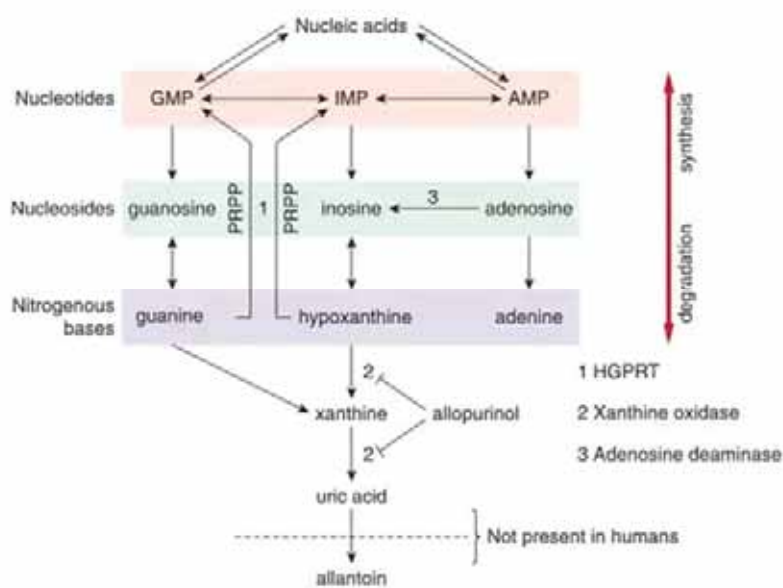


Figure 14: Voie de recyclage des purines

HGPRT : Hypoxanthine-Guanine-PhosphoRibosylTransférase, PRPP : 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate (from : <https://www.quora.com/What-is-the-importance-of-a-salvage-pathway-for-purine-synthesis>)

La première conséquence de la perte de fonction de l'HGPRT est une accumulation d'acide urique qui aboutit à la formation de caillots et progressivement à une insuffisance rénale. Ce symptôme peut, dans une certaine mesure être contrôlé par la prise d'un inhibiteur de la xanthine oxidase, l'allopurinol (**Figure 14**). Dans les cas les plus sévères, l'atteinte rénale s'accompagne d'une atteinte neurologique qui elle n'est pas modifiée par la prise d'allopurinol et ne serait donc pas directement dû à l'accumulation d'acide urique. La survenue des atteintes neurologiques est directement corrélée à l'activité résiduelle de l'enzyme. Elles apparaissent lorsque celle-ci est quasi indétectable dans les cellules du malade et combinent la présence de mouvements anormaux de type dystonie d'action, de contractures généralisée des muscles extenseurs (opisthotonos) provoquant des troubles de la posture ainsi que des symptômes psychiatriques d'hétéro et d'auto-agressivité culminant par des épisodes d'automutilation extrêmement sévères [96].

La première étude post-mortem de cerveaux de malades atteints de la MLN, menée par Lloyd et coll. [97], consistant en l'analyse biochimique des concentrations des principaux neurotransmetteurs dans différentes régions cérébrales, a mis en évidence une diminution des concentrations de tous les anabolites de la voie de synthèse de la dopamine au niveau du striatum ainsi qu'une augmentation de la concentration en sérotonine. En tenant compte de la sensibilité des méthodes utilisées à l'époque, aucune modification des autres neurotransmetteurs, comme le GABA ou l'acétylcholine, n'a été détectée. Cette première étude, réalisée sur 3 malades, suggérait donc qu'une des altérations significatives associées à la perte d'activité de la HGPRT était une perturbation de la balance des neurotransmetteurs régulant les ganglions de la base. Cette étude fût reproduite sur 2 patients supplémentaires en 1999 [98]. L'imagerie médicale a depuis confirmé la présence d'un dysfonctionnement du système dopaminergique au niveau des ganglions de la base puisque la liaison de deux radiotraceurs, la F^{18} -L-DOPA et le C^{11} -WIN-35-428, tous deux liant les terminaisons dopaminergiques au niveau des structures cibles comme le striatum, est fortement réduite chez les malades MLN [99, 100]. Rapportée à la prédominance de symptômes moteurs extrapyramidaux et à la présence d'automutilations, la déplétion en dopamine apparait donc centrale dans le processus physiopathologique associé à la MLN.

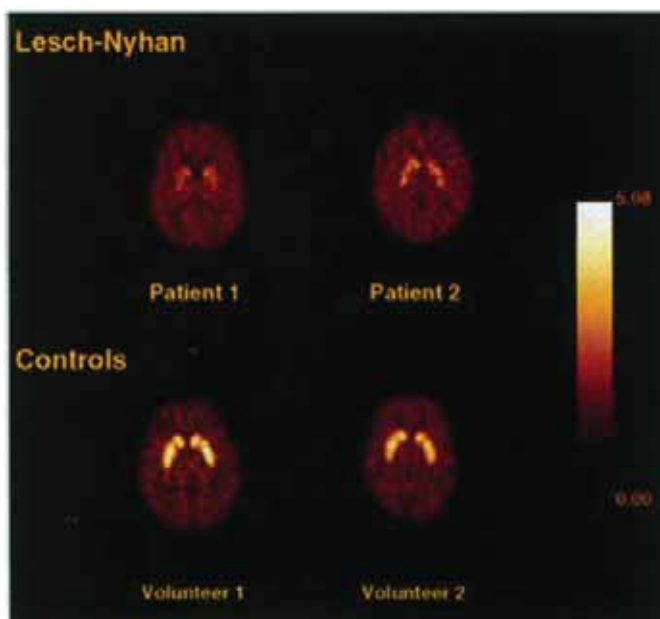


Figure 15 :

Exemple d'acquisitions obtenues en imagerie PET à l'aide du radiotraceur C^{11} -WIN-35-428. L'hyposignal retrouvé chez les patients Lesch-Nyhan indique une réduction de la concentration du transporteur de recapture de la dopamine (DAT) au niveau des noyaux caudés et putamen. D'après Wong et al., 1996.

En effet, dans le cerveau adulte, la dopamine joue un rôle complexe et intervient dans diverses fonctions importantes telles que le comportement, la cognition, les fonctions motrices, la motivation, la récompense, le sommeil ou la mémorisation. La dopamine est principalement synthétisée et libérée par de petites populations de neurones situées au niveau du mésencéphale dans la substance noire pars compacta (SNpc) et dans l'aire tegmentale ventrale (VTA) et qui ont pour cible diverses structures dont les ganglions de la base et le cortex. Trois voies dopaminergiques principales ont été décrites : la voie nigro-striatale, la voie méso-limbique et la voie méso-corticale. Les neurones dopaminergiques de la SNpc projettent majoritairement dans la partie supérieure du striatum, constituée du noyau caudé et du putamen. La voie nigro-striatale représente 80 % des neurones dopaminergiques centraux. Ce réseau constitue un système modulateur du contrôle des fonctions motrices. Les projections dopaminergiques qui trouvent leur origine dans la VTA participent aux deux autres voies. Dans la voie méso-limbique, elles ont pour cible plusieurs composants du système limbique, notamment le noyau

accumbens, l'amygdale et l'hippocampe. Ce réseau neuronal représente le système de récompense / renforcement du cerveau et participe au contrôle des processus motivationnels. Dans la voie méso-corticale, les neurones de la VTA projettent sur le cortex préfrontal. Cette voie est impliquée dans les processus de concentration et certaines fonctions exécutives comme la mémoire de travail ^[101, 102].

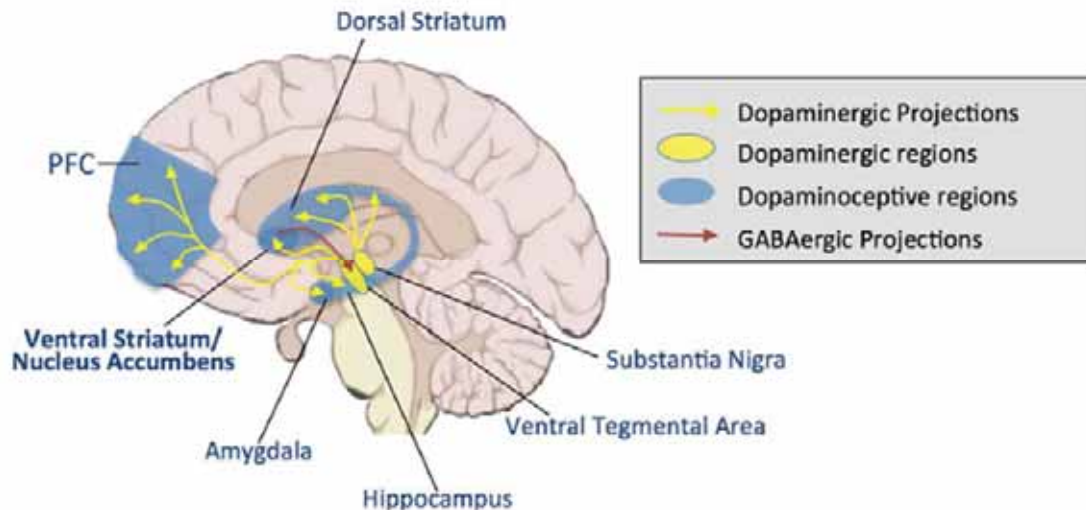


Figure 16 : Les différentes projections dopaminergiques du CNS. PFC : cortex préfrontal.

L'origine de la déplétion en dopamine dans la MLN et l'implication du déficit en purines dans son apparition restent incomprises. Plusieurs hypothèses ont en effet été envisagées. Les défauts métaboliques, notamment l'accumulation d'hypoxanthine et la diminution de la disponibilité de la guanine peuvent en théorie impacter directement la synthèse dopamine ^[103] ou l'efficacité de la neurotransmission dépendante de la dopamine ^[104, 105, 106]. D'autres études apportent des arguments en faveur d'un défaut de développement, notamment d'une dérégulation des programmes génétiques associés à la neurogénèse en générale et à la formation et à la maintenance des neurones dopaminergiques en particulier, incluant le gène *Engrailed-1* (*EN-1*) et des éléments de la voie *Wnt* ^[107, 108, 109, 110]. Toutefois, les anomalies d'expression de gènes ayant été rapportées dans des systèmes cellulaires dans lesquels ces gènes n'ont pas de rôle ou un rôle différent de celui décrit dans les cellules neurales ou neuronales primaires (cellules isolées de tumeurs ou immortalisés), l'impact exact de ces modifications et leur pertinence dans le cadre de la MLN restent à établir. Il n'est, de plus, évidemment pas exclu que la perte de fonction de la *HGPRT* impacte d'autres systèmes neuronaux que le système dopaminergique. En l'absence d'une relation claire entre la perte d'activité de l'*HGPRT* et ses conséquences au niveau cérébrale, il est difficile d'envisager de contrôler les symptômes neurologiques et psychiatriques associés à la MLN. Afin de discriminer parmi ces différentes hypothèses, nous proposons d'utiliser les cellules souches pluripotentes (iPSC ou hESC), reprogrammées à partir de fibroblastes d'enfants atteints de la MLN ou invalidées génétiquement par la technique CRISPR/cas9, pour comparer la formation, la maturation et la survie de neurones en présence ou en absence d'activité *HGPRT*. Une étape clé de ce projet est donc de reproduire le développement des neurones concernés à partir des cellules souches pluripotentes.

Au cours du développement, les neurones dopaminergiques prennent leur origine dans la partie la plus ventrale du mésencéphale embryonnaire, dans un domaine discret du plancher (Floor plate, FP) défini comme le domaine D1 (**Figure 17**). De cette région D1 émerge aussi les neurones GABAergiques de la SN pars reticulata (SNpr) et de la VTA. Le domaine D2, situé au niveau de la plaque basale donne

naissance aux neurones des noyaux rouges (GABAergiques) et oculo-moteurs (cholinergiques). De manière intéressante, le domaine D3 situé plus dorsalement, dans la plaque alaire, donne naissance à un groupe de neurones sérotoninergiques qui migreront ensuite vers les noyaux du raphé ^[111]. Plusieurs morphogènes travaillent de concert afin de d'établir l'identité des différents progéniteurs du mésencéphale ventral plus particulièrement le FGF-8 (Fibroblast Growth Factor-8) et le Wnt-1 (Wingless Integrated) dont les gradients de concentration participent à l'établissement de l'axe antéro-postérieur, et la protéine SHH (Sonic Hedgehog) dont le gradient de concentration contribue à définir la position selon l'axe dorso-ventral ^[112, 113]. L'exposition temporelle à ces facteurs contribue elle à établir les différents domaines dans le mésencéphale ventrale, à maintenir le pool de progéniteurs prolifératifs non différenciés ou au contraire à induire la migration médo-latérale au sein d'un domaine qui conditionne la différenciation en neurones ^[1]. L'intégration des voies de signalisation activées par ces facteurs extrinsèques contribue à activer ou inhiber l'expression des différents gènes signant l'acquisition d'une identité régionale ou d'un état de différenciation. Le facteur de transcription OTX2 est un des gènes clés gouvernant l'activation du programme transcriptionnel qui permet la mise en place du mésencéphale ^[114]. FoxA2 marque les domaines les plus ventraux, situés dans le plancher et la plaque basale. Les progéniteurs dopaminergiques situés dans le domaine D1 expriment LMX1a et LMX1b puis au cours de leur maturation EN-1, Nurr-1 et Raldh1. Le domaine D2 adjacent est caractérisé par l'expression conjointe de FoxA2 et de NKX6.1. Le domaine D3 est délimité par les progéniteurs exprimant NKX2.2. D'autres facteurs de transcription tels que PITX3 contrôlent la maturation finale des neurones dopaminergiques et l'expression des enzymes de synthèse de la dopamine, comme la tyrosine hydroxylase (TH) ainsi que les transporteurs DAT et Vmat2 ^[115, 116, 117].

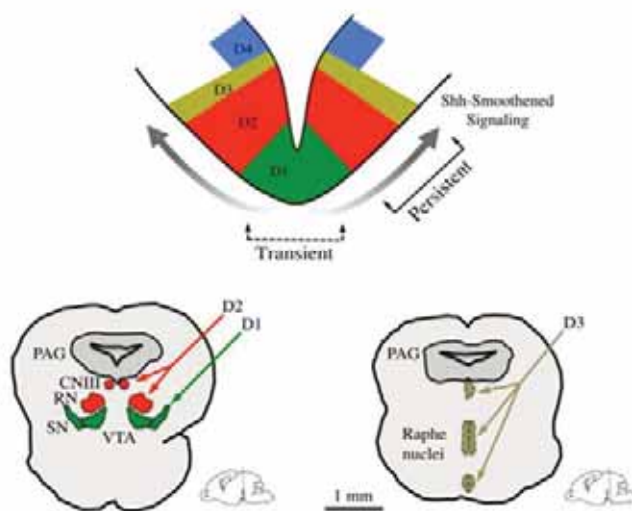


Figure 17:

Les différents domaines du mésencéphale ventral embryonnaire tel que décrit chez la souris (en haut) ainsi que les différents types de neurones en dérivant (en bas). PAG : substance grise périaqueducule, RN : noyau rouge, SN : Substance Noire, VTA : aire tegmentale ventrale, CNIII : noyau oculo-moteur. D'après [1]

En prenant en compte ces connaissances obtenues chez la souris principalement, la première étape de ce projet consistera à développer des protocoles de différenciation utilisant des combinaisons des différents morphogènes afin de récapituler la genèse des différents types de neurones du mésencéphale ventral et de leur cellules compagnons, notamment les astrocytes. L'engouement autour de l'utilisation des hPSC pour obtenir des neurones dopaminergiques dans le cadre de la thérapie cellulaire de substitution pour la maladie de Parkinson a permis de définir un certain nombre de protocoles visant à produire une fraction de cellules exprimant les marqueurs précoces des progéniteurs dopaminergiques (notamment OTX2, FOXA2 et LMX1a). Un des obstacles à

l'utilisation directe de ces protocoles pour la modélisation de la MLN réside dans le fait qu'ils visent à produire des progéniteurs très immatures, capables de survivre et de s'intégrer dans le cerveau de l'hôte. De plus, la fraction de progéniteurs dopaminergiques réellement produite est assez faible, le reste des cellules obtenues étant par ailleurs très mal, voir pas caractérisé. Toutefois, ils ont permis de poser les bases concernant les facteurs à utiliser pour induire la différenciation des hPSC en progéniteurs précoces du mésencéphale ventral. En particulier, les travaux de Kirkeby et coll. ont permis de définir les combinaisons de SHH et d'un inhibiteur de la GSK-3, le CHIR99021, qui simule l'activation de la voie canonique dépendante de Wnt, permettant de moduler la régionalisation des progéniteurs neuraux le long des axes dorso-ventral et antéro-postérieur respectivement [44]. Ce protocole de base sera modifié et adapté pour pouvoir pousser la maturation des progéniteurs. En allongeant les durées d'exposition aux différents morphogènes, nous espérons récapituler l'apparition progressive des domaines D1 à D4 du mésencéphale ventral, puis induire la maturation progressive des progéniteurs vers les différents types de neurones produits dans cette région, en particulier les neurones dopaminergiques bien-sûr, mais aussi les neurones GABAergiques de la VTA, les neurones oculo-moteurs et les neurones sérotoninergiques. A côté des neurones, la différenciation astrocytaire sera aussi étudiée. Les profils d'expression de gènes seront établis en qPCR et la proportion des différents sous-types cellulaires en ICC.

Afin d'étudier le rôle de la HGPRT dans la mise en place des différents domaines de progéniteurs et les différents types de neurones, un premier modèle, consistant l'inactivation génétique de la HGPRT dans une lignée de hESC sauvage (SA001), par la technique CRISPR/Cas9, sera utilisée (**Figure 18**). Les anomalies éventuellement détectées seront ensuite vérifiées dans un deuxième modèle basé sur l'utilisation d'iPSC dérivées d'individus sains ou d'enfants atteint de la MLN.

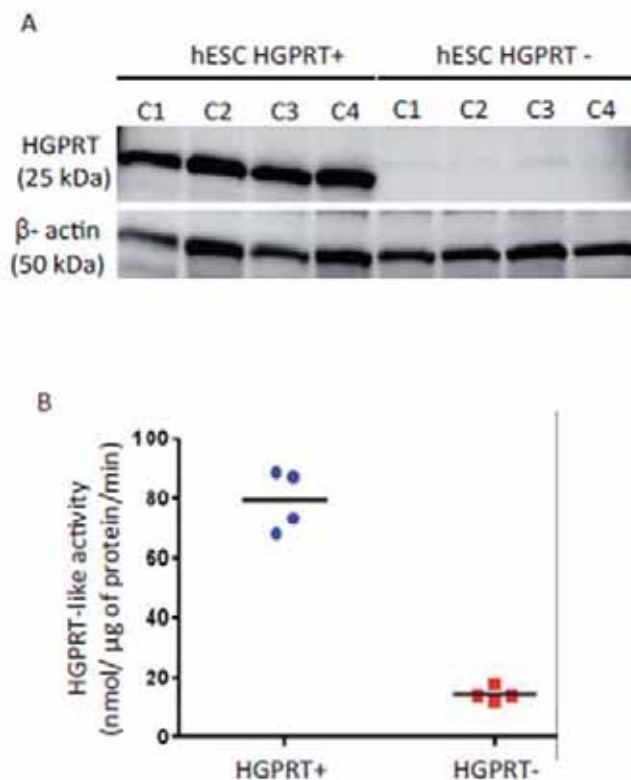


Figure 18 : Invalidation de la HGPRT dans les cellules hESC SA001 par la technique CRISPR/Cas9.

A : analyse de la présence de la protéine HGPRT par immuno-blot dans 4 lignées clones (C1 à C4) issues de la souche SA001 sauvage (HGPRT +) ou éditée grâce à la technique CRISPR/cas9 (HGPRT -).

B : quantification de l'activité enzymatique HGPRT dans des extraits cellulaires obtenus à partir des différents clones

Les différences phénotypiques et moléculaires entre les cellules présentant une activité HGPRT et les cellules déficientes, d'origines corticales ou mésencéphaliques, seront analysées en utilisant le panel de techniques, notamment d'imagerie cellulaire à haut contenu automatisée, développées durant les 5 dernières années dans notre équipe. Ceci permettra de déterminer si le modèle récapitule le déficit dopaminergique et quelle(s) étape(s) des processus de production, maturation et survie des neurones dopaminergiques est compromise dans la MLN. Cette analyse nous permettra aussi de déterminer si le système cortical est impacté par la perte d'activité de la HGPRT.

En plus d'apporter de nouvelles connaissances fondamentales sur le rôle d'un gène dit « de ménage » sur le développement cérébral humain, notre étude devrait permettre de choisir parmi différentes options thérapeutiques. En effet, il est possible qu'une approche purement pharmacologique ne soit envisageable que si le phénotype anormal est supposé réversible après la naissance, ce qui est le cas par exemple si la perte de fonction de la HGPRT perturbe sélectivement la synthèse, le catabolisme ou la recapture de la dopamine. Une approche pharmacologique apparaît plus compliquée à mettre en œuvre si le défaut de neurogenèse est plus précoce et touche par exemple l'efficacité de formation des neurones dopaminergiques. Dans ce cas, il faudra envisager une approche complémentaire. Une possibilité réside dans la thérapie génique visant à induire la synthèse de dopamine directement par les cellules cibles, notamment au niveau des ganglions de la base et plus particulièrement du striatum. Une telle approche à montrer des résultats prometteurs dans la maladie de Parkinson (donc chez l'adulte) tant en terme de sécurité du vecteur que d'efficacité, dans ce cas particulier sur les mouvements anormaux ^[118]. On pourrait envisagée de l'adapter à l'enfant dans le cadre de la MLN.

III-2 : TROUBLES NEURODEVELOPPEMENTAUX ASSOCIES AUX DYSTROPHINOPATHIES

Les maladies neuromusculaires sont considérées comme des pathologies touchant principalement les muscles et/ou le système nerveux périphérique (SNP). Cependant, il est de plus en plus admis que ces pathologies s'accompagnent aussi de dysfonctionnements du système nerveux central (SNC), se manifestant par des troubles cognitifs et psychiatriques. Les dystrophinopathies, comprenant notamment la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) et la dystrophie musculaire de Becker (BMD), représentent des troubles neuromusculaires prototypiques avec une origine génétique connue associée à des altérations claires du fonctionnement du SNC. Les dystrophinopathies représentent l'ensemble des pathologies associées à des mutations dans le gène *DMD*. Il est localisé sur le bras court du chromosome X et code pour différentes isoformes de la dystrophine transcrites à partir de 7 promoteurs reconnus présentant chacun une expression différentielle en fonction du type cellulaire et du stade de développement (**Figure 19**, ^[119]). Trois isoformes, dp427, dp140 et dp71, sont plus spécifiquement exprimées dans les différents types cellulaires du cerveau, tels que les neurones et les astrocytes, à différents stades de développement ^[120].

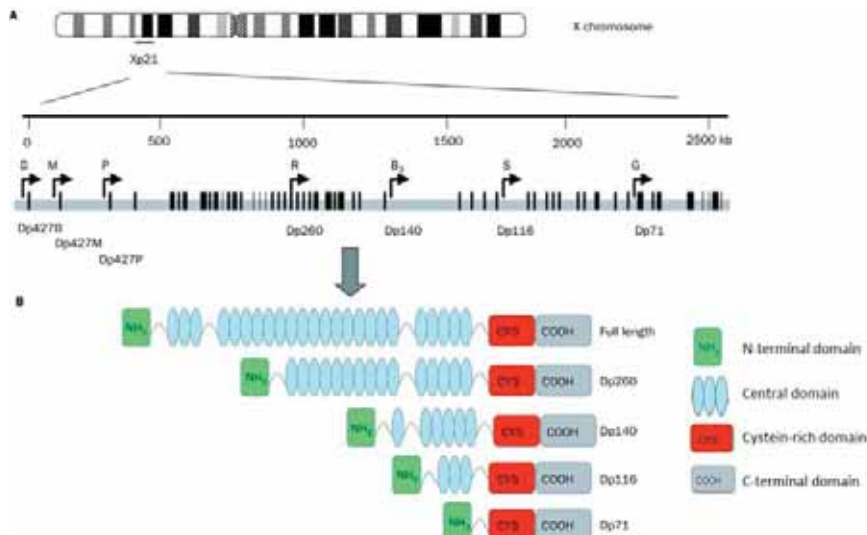


Figure 19 : Les différents produits du gène DMD

A : Représentation schématique de la position du gène et de la structure du gène DMD. La position des 7 différents promoteur correspondant au départ de transcription des différentes isoformes est indiquée par une flèche. Dp : Dystrophin product, B : Brain, M, Muscle, P : Purkinje, R : Retina, S : S-dystrophin, G: G-dystrophin.

B: Structure des différentes isoformes

D'après ^[119]

Chez les garçons affectés par des mutations du gène *DMD* on retrouve souvent un retard global de développement ainsi qu'un taux plus élevé de déficience intellectuelle, de déficits cognitifs, d'apprentissage et de mémoire à court terme ^[121, 122, 123, 124]. De plus, l'incidence des troubles du spectre autistique (TSA), des défauts d'attention et des troubles obsessionnels-compulsifs est plus élevée chez les patients atteints de dystrophinopathies ^[125, 126, 127]. L'ensemble de ses dysfonctions sont présentes dès la naissance et non évolutives, ce qui contraste avec la pathologie musculaire et suggère la mise en cause d'un mécanisme développemental plutôt que dégénératif. L'imagerie cérébrale ne montre pas d'anomalies macroscopiques spécifiques mais une diminution globale du volume du cerveau attribuable en partie à une diminution du volume de la matière grise ^[128]. En imagerie TEP, le traceur ¹⁸FDG révèle non seulement un hypométabolisme du glucose localisé dans les zones cérébrales impliquées dans le contrôle et la perception de la motricité mais aussi dans l'hippocampe et le système limbique, deux régions impliquées dans l'apprentissage et la mémorisation ^[129]. Il n'y a pas de corrélation bien établie entre génotype et phénotype concernant le type ou la sévérité des troubles du SNC mais les mutations localisées dans la partie distale du gène (>exon 45), plus susceptibles d'affecter l'expression des isoformes dp71 et dp140, sont plus souvent associées à des phénotypes cognitifs et psychiatriques sévères ^[130, 131]. Cependant, le rôle exact des différentes isoformes de la dystrophine dans le cerveau humain demeure mal connu, ce qui réduit la possibilité d'interventions thérapeutiques.

La dystrophine dp427 est l'isoforme la plus longue et est considérée comme étant la forme prototypique. Elle s'exprime à la fois dans le muscle et dans le cerveau. L'ARNm de la forme cérébrale est transcrit à partir d'un promoteur spécifique qui est différent de celui de la forme musculaire ^[132]. La dp427 est une grande protéine de 3685 acides aminés (427kDa) en forme de bâtonnet qui possède une grande analogie de structure avec la spectrine et l'alpha-actinine. Elle est composée de quatre domaines distincts (un domaine N-terminal, un domaine central, un domaine riche en cystéine et un domaine C-terminal) impliqués dans l'inclusion de la dystrophine au sein d'un large complexe de protéines et de glycoprotéines (complexe glycoprotéique associé à la dystrophine ou CGD) qui forme

un pont entre le cytosquelette d'actine et la matrice extracellulaire (**Figure 20**, [133]). Si la composition et la fonction du complexe CGD dans le muscle sont bien caractérisées, elles sont moins documentées dans le cerveau. A côté d'un rôle structurel, le DGC est également impliqué dans la signalisation cellulaire via l'interaction de la dystrophine avec des protéines de signalisation telles que l'oxyde nitrique synthétase neuronale (nNOS), la Grb2 et la caveoline-3 [134].

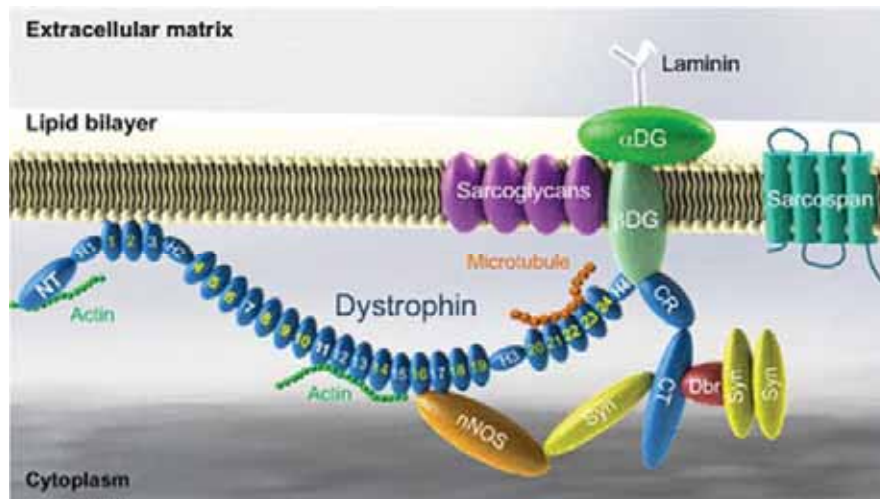


Figure 20 : Organisation du complexe glycoprotéique associée à la dp427 dans le muscle
 Les domaines N-terminal (NT), central, riche en cystéine (CR) et C-terminal (CT) sont représentés. DG : Dystroglycane, nNOS : NO Synthase neuronale, Syn : Syntrophine, Dbr : Dystrobrevine.
 D'après [133]

Dans le cerveau, la dp427 est particulièrement exprimée dans l'hippocampe, le système limbique et le cervelet [135, 120]. Elle a été associée chez les rongeurs à la concentration des récepteurs GABAergiques au niveau des fentes synaptiques. Les souris MDX, qui n'expriment pas cette isoforme, montrent une altération de la mémoire à court terme et une altération de la plasticité cérébrale dans l'hippocampe [136]. Les isoformes courtes de dystrophine sont toutes dépourvues du domaine N-terminal de l'isoforme dp427 et possède un domaine spécifique pour chaque isoformes. Elles sont graduellement tronquées du domaine central. Elles conservent cependant la partie riche en cystéine et la partie C-terminale (**Figure 19**). La Dp71 est l'isoforme majoritaire dans le SNC. Son expression a été rapportée dans les neurones, en particulier à proximité de la densité post-synaptique des synapses glutamatergiques. Elle est aussi exprimée dans les astrocytes tissulaires et périvasculaires de la barrière hématoencéphalique (BHE). Elle y est impliquée dans l'homéostasie du K⁺ et de l'eau en contrôlant la localisation des canaux KIR4 et des aquaporines respectivement [137, 138, 139, 140]. Les souris invalidées spécifiquement pour cette isoforme présentent des phénotypes plus sévères que les souris MDX, comme un excès d'anxiété, d'impulsivité et d'importants déficits d'apprentissage [141, 142]. On sait peu de choses sur le rôle de l'isoforme dp140 dont l'expression semble restreinte au cerveau foetal [143, 120].

L'ensemble de ces études, principalement menées sur des modèles de souris, suggèrent donc qu'à la fois le type et la gravité des troubles cognitifs et psychiatriques associés aux dystrophinopathies sont dépendants des isoformes touchées par une mutation donnée puisque chaque isoforme jouerait un rôle spécifique dans le fonctionnement cérébral. Ici, nous proposons d'utiliser les modèles cellulaires dérivés des hPSC pour étudier les substrats biologiques sous tendant les altérations du SNC liées aux

dystrophinopathies humaines. L'un de nos objectifs sera de mieux comprendre le rôle des deux isoformes courtes dp140 et dp71 comparé à l'isoforme dp427, et ce afin d'établir une association plus directe génotype / phénotype entre le type de mutation retrouvée chez les patients DMD et le type et la gravité des troubles cérébraux associés. L'impact de la perte de fonction sélective de chaque isoforme sera étudié dans plusieurs systèmes cellulaires différenciés à partir des hPSC. Nous nous intéresserons plus particulièrement aux neurones corticaux, impliqués dans la cognition, aux neurones du mésencéphale ventral, centraux dans la régulation de l'attention et le contrôle de l'impulsivité, ainsi qu'à un modèle de barrière hémato-encéphalite (BHE) combinant astrocytes et cellules endothéliales. En plus de permettre d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles, définir les substrats biologiques du dysfonctionnement cérébral dans les dystrophinopathies aidera à établir si certaines voies sont communes aux autres troubles neurodéveloppementaux, comme par exemple les formes génétiques de TSA, de déficience intellectuelle ou de déficits d'apprentissage, de sorte que certaines options thérapeutiques utilisées avec succès pour ces troubles pourraient être réutilisées ou adaptées aux dystrophinopathies. Il est intéressant de noter que comme les protéines de la famille SHANK, impliquées directement dans les TSA avec déficience intellectuelle, les isoformes de la dystrophine sont aussi impliquées dans un complexe multiprotéique liant le cytosquelette d'actine à la membrane cellulaire. Pris ensemble, ces travaux devraient aider à mieux comprendre l'étiologie des troubles du SNC associés aux mutations dans le gène DMD, établir une corrélation génotype / phénotype plus claire et enfin aider à stratifier les patients à offrir les meilleures options de soins.

Pour atteindre ces objectifs, ce projet sera organisé en 3 parties:

1- Caractérisation des profils d'expression des 3 isoformes dp427, dp140 et dp71 dans les réseaux de neurones et les composants cellulaires de la BHE.

La plupart des données d'expression concernant les isoformes de la dystrophine ont été obtenues dans le cerveau de rongeurs et restent partielles. Fait important, les données concernant l'expression de ses isoformes au cours du développement restent parcellaires. Les réseaux de neurones différenciés de hPSC fournissent donc un substrat unique pour suivre l'expression différentielle de ses isoformes de dystrophine au cours du temps, des progéniteurs aux cellules fonctionnelles entièrement différenciées. Nous proposons de commencer par analyser les profils d'expression des isoformes dp427, dp140 et dp71 dans 2 systèmes neuronaux d'intérêt, les neurones des couches superficielles du cortex et les neurones du mésencéphale ventral. Le système de neurones corticaux humains, précédemment mis en place dans l'équipe ^[13], a déjà été utilisé avec succès dans le contexte de la DM1 ^[144], des formes génétiques des TSA ^[16], et de la déficience intellectuelle ^[145], à la fois pour élucider les mécanismes pathologiques et pour effectuer le dépistage de molécules potentiellement thérapeutiques. Ce réseau est composé de neurones de projection glutamatergiques et d'interneurones GABAergiques impliqués dans les processus d'apprentissage humain, l'acquisition du langage et la cognition. L'expression des différentes isoformes de la dystrophine sera étudiée dans un autre réseau constitué par les neurones du mésencéphale ventral, plus particulièrement les neurones dopaminergiques (DA) et les interneurones GABAergiques. Ce réseau est impliqué dans le contrôle de l'attention et de l'impulsivité, deux comportements qui seraient affectés chez les garçons porteur de mutations DMD ^[125, 146]. Un certain nombre de patients tire un bénéfice d'un traitement par méthylphénidate (Ritaline®), une amphétamine agissant directement sur la sécrétion de dopamine, toutefois la majorité des enfants ne peut bénéficier de ce traitement à cause de contre-indications

cardiaques. A côté des réseaux de neurones, l'expression des isoformes de la dystrophine sera documentée dans un système *in vitro* modélisant la BHE à partir d'astrocytes et de cellules endothéliales microvasculaires du cerveau (BMEC) différenciées à partir des hPSC^[147]. L'expression de l'isoforme dp71 a été décrite dans les astrocytes^[148], en particulier au niveau des pieds astrocytaires de la BHE où elle stabiliserait l'aquaporine 4 à la membrane^[149]. La dp71 est donc potentiellement impliquée dans la régulation de la fonction de la BHE. En ce sens, l'IRM montre une diminution de la perfusion cérébrale chez les souris mdx^[150] et chez les patients DMD^[151].

L'expression de chaque isoforme sera quantifiée au niveau transcriptionnel par qPCR, au niveau protéique par Western blot et, selon la disponibilité d'anticorps discriminants, la localisation subcellulaire sera analysée en utilisant l'immunocytochimie. L'étude cinétique au cours du développement est particulièrement cruciale pour l'isoforme dp140 qui est décrite comme restreinte au cerveau fœtal. Cela aidera également à établir la fenêtre développementale pendant laquelle la dp427 et la dp71 commencent à être exprimées et si un patron d'expression spécifique existe en fonction du type cellulaire.

2- Etude du rôle de chaque isoforme par invalidation différentielle.

Les différentes isoformes de dystrophine seront sélectivement invalidées dans des lignées mâles de hPSC en ciblant leurs promoteurs spécifiques par une stratégie utilisant le système CRISPR/Cas9. La différenciation dans les réseaux de neurones pertinents et dans les différents sous types composant la BHE sera alors effectuée. Les modifications phénotypiques, plus particulièrement, la formation, l'architecture et la fonctionnalité des réseaux neuronaux, seront suivies par imagerie à haut débit et à haut contenu. L'organisation et la dynamique du cytosquelette d'actine/myosine seront étudiées en utilisant la microscopie à super-résolution N-STORM en collaboration avec l'équipe du Dr Z. Lenkei (CPN, Paris). Les interactions cellule-cellule et cellule/matrice, l'orientation, la polarisation et la perméabilité de la BHE seront évaluées. Pris ensemble ces résultats offriront une meilleure caractérisation des principaux dysfonctionnements cellulaires spécifiquement induits par la perte de fonction d'une isoforme donnée. Afin d'établir une relation génotype/phénotype plus documentée, des iPSC seront reprogrammées à partir de cellules somatiques de patients DMD. Une collection est disponible au Généthon avec une caractérisation clinique et génétique complète. L'objectif est d'évaluer la robustesse des résultats obtenus à l'aide du modèle isogénique et de corréler les résultats cellulaires avec les profils cliniques des patients. Cela permettra de mieux stratifier les patients puis d'évaluer l'efficacité des stratégies thérapeutiques.

3- Évaluation de l'efficacité de traitements pharmacologiques à restaurer les systèmes cellulaires perturbés par la perte de fonction des isoformes de la dystrophine.

Sur la base des résultats obtenus au cours des 2 premières parties, l'objectif sera de proposer des pistes d'interventions pharmacologiques aux patients présentant les profils cliniques les plus sévères. La pertinence des altérations cellulaires identifiées dans les lignées isogéniques puis validées dans les iPSC dérivées des cellules de malades en tant que biomarqueurs pour tester des composés pharmacologiques sera évaluée, puis les essais de criblage développés. Deux catégories de composés pharmacologiques seront étudiées. Selon les signatures cellulaires identifiées dans la partie 2, certains composés connus pour agir directement sur ces cibles seront testés dans une approche basée sur l'hypothèse. En parallèle, une autre approche consistera à cribler, sans à priori de mode d'action, des

collections de composés approuvés par la FDA directement pour leur capacité à corriger les dysfonctions cellulaires en ce en utilisant une combinaison de criblage à haut débit et d'imagerie à haut contenu comme précédemment réalisée pour les formes génétiques de TSA. L'efficacité des composés sélectionnés pourra ensuite être évaluée précliniquement et cliniquement en partenariat avec les équipes de Généthon (modèles animaux) et de l'Institut de Myologie (modèles animaux et cliniciens).

IV- REFERENCES

1. Tang, M., et al., *Temporal and spatial requirements of Smoothed in ventral midbrain neuronal development*. *Neural Dev*, 2013. **8**: p. 8.
2. Benchoua, A., et al., *Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction*. *J Neurosci*, 2001. **21**(18): p. 7127-34.
3. Benchoua, A., et al., *Active caspase-8 translocates into the nucleus of apoptotic cells to inactivate poly(ADP-ribose) polymerase-2*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(37): p. 34217-22.
4. Benchoua, A., et al., *Activation of proinflammatory caspases by cathepsin B in focal cerebral ischemia*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004. **24**(11): p. 1272-9.
5. Guegan, C., et al., *PTD-XIAP protects against cerebral ischemia by anti-apoptotic and transcriptional regulatory mechanisms*. *Neurobiol Dis*, 2006. **22**(1): p. 177-86.
6. Onteniente, B., *Natural and synthetic inhibitors of caspases: targets for novel drugs*. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 2004. **3**(4): p. 333-40.
7. Zala, D., et al., *Progressive and selective striatal degeneration in primary neuronal cultures using lentiviral vector coding for a mutant huntingtin fragment*. *Neurobiol Dis*, 2005. **20**(3): p. 785-98.
8. Lowell, S., et al., *Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells*. *PLoS Biol*, 2006. **4**(5): p. e121.
9. Benchoua, A., et al., *Dopamine determines the vulnerability of striatal neurons to the N-terminal fragment of mutant huntingtin through the regulation of mitochondrial complex II*. *Hum Mol Genet*, 2008. **17**(10): p. 1446-56.
10. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. *Science*, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
11. Pollard, S.M., A. Benchoua, and S. Lowell, *Neural stem cells, neurons, and glia*. *Methods Enzymol*, 2006. **418**: p. 151-69.
12. Boissart, C., et al., *miR-125 potentiates early neural specification of human embryonic stem cells*. *Development*, 2012. **139**(7): p. 1247-57.
13. Boissart, C., et al., *Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening*. *Transl Psychiatry*, 2013. **3**: p. e294.
14. Georges, P., et al., *Protein Kinase-A Inhibition Is Sufficient to Support Human Neural Stem Cells Self-Renewal*. *Stem Cells*, 2015. **33**(12): p. 3666-72.
15. Nakagawa, M., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts*. *Nat Biotechnol*, 2008. **26**(1): p. 101-6.
16. Darville, H., et al., *Human Pluripotent Stem Cell-derived Cortical Neurons for High Throughput Medication Screening in Autism: A Proof of Concept Study in SHANK3 Haploinsufficiency Syndrome*. *EBioMedicine*, 2016. **9**: p. 293-305.
17. Lozano, R., et al., *Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*. *Lancet*, 2012. **380**(9859): p. 2095-128.
18. Tau, G.Z. and B.S. Peterson, *Normal development of brain circuits*. *Neuropsychopharmacology*, 2010. **35**(1): p. 147-68.
19. Wolff, J.R. and M. Missler, *Synaptic reorganization in developing and adult nervous systems*. *Ann Anat*, 1992. **174**(5): p. 393-403.
20. Gage, F.H. and S. Temple, *Neural stem cells: generating and regenerating the brain*. *Neuron*, 2013. **80**(3): p. 588-601.

21. Zhao, X. and D.L. Moore, *Neural stem cells: developmental mechanisms and disease modeling*. Cell Tissue Res, 2018. **371**(1): p. 1-6.
22. Ernst, C., *Proliferation and Differentiation Deficits are a Major Convergence Point for Neurodevelopmental Disorders*. Trends Neurosci, 2016. **39**(5): p. 290-9.
23. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature, 1981. **292**(5819): p. 154-6.
24. Nichols, J., et al., *Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4*. Cell, 1998. **95**(3): p. 379-91.
25. Chambers, I., et al., *Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells*. Cell, 2003. **113**(5): p. 643-55.
26. Nichols, J. and A. Smith, *Pluripotency in the embryo and in culture*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(8): p. a008128.
27. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 2007. **131**(5): p. 861-72.
28. Yu, J., et al., *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1917-20.
29. Daley, G.Q., et al., *Setting Global Standards for Stem Cell Research and Clinical Translation: The 2016 ISSCR Guidelines*. Stem Cell Reports, 2016. **6**(6): p. 787-797.
30. Jessell, T.M. and J.R. Sanes, *Development. The decade of the developing brain*. Curr Opin Neurobiol, 2000. **10**(5): p. 599-611.
31. Monk, C.S., S.J. Webb, and C.A. Nelson, *Prenatal neurobiological development: molecular mechanisms and anatomical change*. Dev Neuropsychol, 2001. **19**(2): p. 211-36.
32. Laffont, J., *Embryology of the brain*. J Neuroradiol, 1982. **9**(1): p. 5-14.
33. Fotos, J., R. Olson, and S. Kanekar, *Embryology of the brain and molecular genetics of central nervous system malformation*. Semin Ultrasound CT MR, 2011. **32**(3): p. 159-66.
34. Hatten, M.E., *The role of migration in central nervous system neuronal development*. Curr Opin Neurobiol, 1993. **3**(1): p. 38-44.
35. Kornack, D.R. and P. Rakic, *Radial and horizontal deployment of clonally related cells in the primate neocortex: relationship to distinct mitotic lineages*. Neuron, 1995. **15**(2): p. 311-21.
36. Pencea, V., et al., *Neurogenesis in the subventricular zone and rostral migratory stream of the neonatal and adult primate forebrain*. Exp Neurol, 2001. **172**(1): p. 1-16.
37. Florio, M. and W.B. Huttner, *Neural progenitors, neurogenesis and the evolution of the neocortex*. Development, 2014. **141**(11): p. 2182-94.
38. Kiecker, C. and A. Lumsden, *The role of organizers in patterning the nervous system*. Annu Rev Neurosci, 2012. **35**: p. 347-67.
39. Watson, S., C. Serrate, and S. Vignot, *[Sonic Hedgehog signaling pathway: from embryology to molecular targeted therapies]*. Bull Cancer, 2010. **97**(12): p. 1477-83.
40. Lupo, G., W.A. Harris, and K.E. Lewis, *Mechanisms of ventral patterning in the vertebrate nervous system*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(2): p. 103-14.
41. Chizhikov, V.V. and K.J. Millen, *Mechanisms of roof plate formation in the vertebrate CNS*. Nat Rev Neurosci, 2004. **5**(10): p. 808-12.
42. Marklund, M., et al., *Retinoic acid signalling specifies intermediate character in the developing telencephalon*. Development, 2004. **131**(17): p. 4323-32.
43. Wexler, E.M. and D.H. Geschwind, *Out FOXing Parkinson disease: where development meets neurodegeneration*. PLoS Biol, 2007. **5**(12): p. e334.
44. Kirkeby, A., et al., *Generation of regionally specified neural progenitors and functional neurons from human embryonic stem cells under defined conditions*. Cell Rep, 2012. **1**(6): p. 703-14.
45. Tao, Y. and S.C. Zhang, *Neural Subtype Specification from Human Pluripotent Stem Cells*. Cell Stem Cell, 2016. **19**(5): p. 573-586.
46. Perrier, A.L., et al., *Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(34): p. 12543-8.
47. Watanabe, K., et al., *Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells*. Nat Neurosci, 2005. **8**(3): p. 288-96.
48. Ying, Q.L., et al., *Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(2): p. 183-6.
49. Chambers, S.M., et al., *Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(3): p. 275-80.
50. Chua, J.H., A. Armugam, and K. Jeyaseelan, *MicroRNAs: biogenesis, function and applications*. Curr Opin Mol Ther, 2009. **11**(2): p. 189-99.

51. Fineberg, S.K., K.S. Kosik, and B.L. Davidson, *MicroRNAs potentiate neural development*. *Neuron*, 2009. **64**(3): p. 303-9.
52. Rybak, A., et al., *A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment*. *Nat Cell Biol*, 2008. **10**(8): p. 987-93.
53. Cao, X., S.L. Pfaff, and F.H. Gage, *A functional study of miR-124 in the developing neural tube*. *Genes Dev*, 2007. **21**(5): p. 531-6.
54. Sempere, L.F., et al., *Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation*. *Genome Biol*, 2004. **5**(3): p. R13.
55. Smirnova, L., et al., *Regulation of miRNA expression during neural cell specification*. *Eur J Neurosci*, 2005. **21**(6): p. 1469-77.
56. Wulczyn, F.G., et al., *Post-transcriptional regulation of the let-7 microRNA during neural cell specification*. *FASEB J*, 2007. **21**(2): p. 415-26.
57. Brennand, K.J., et al., *Modeling psychiatric disorders at the cellular and network levels*. *Mol Psychiatry*, 2012. **17**(12): p. 1239-53.
58. Ferland, R.J. and R. Guerrini, *Nodular heterotopia is built upon layers*. *Neurology*, 2009. **73**(10): p. 742-3.
59. Smiley, J.F., et al., *Altered volume and hemispheric asymmetry of the superficial cortical layers in the schizophrenia planum temporale*. *Eur J Neurosci*, 2009. **30**(3): p. 449-63.
60. Hutsler, J.J. and H. Zhang, *Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders*. *Brain Res*, 2010. **1309**: p. 83-94.
61. Kwon, H.B., et al., *Neuroigin-1-dependent competition regulates cortical synaptogenesis and synapse number*. *Nat Neurosci*, 2012. **15**(12): p. 1667-74.
62. Hill, R.S. and C.A. Walsh, *Molecular insights into human brain evolution*. *Nature*, 2005. **437**(7055): p. 64-7.
63. Hutsler, J.J., D.G. Lee, and K.K. Porter, *Comparative analysis of cortical layering and supragranular layer enlargement in rodent carnivore and primate species*. *Brain Res*, 2005. **1052**(1): p. 71-81.
64. Fame, R.M., J.L. MacDonald, and J.D. Macklis, *Development, specification, and diversity of callosal projection neurons*. *Trends Neurosci*, 2011. **34**(1): p. 41-50.
65. Rash, B.G. and E.A. Grove, *Area and layer patterning in the developing cerebral cortex*. *Curr Opin Neurobiol*, 2006. **16**(1): p. 25-34.
66. Kadoshima, T., et al., *Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(50): p. 20284-9.
67. Kwan, K.Y., N. Sestan, and E.S. Anton, *Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex*. *Development*, 2012. **139**(9): p. 1535-46.
68. Hansen, D.V., et al., *Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex*. *Nature*, 2010. **464**(7288): p. 554-561.
69. Eiraku, M., et al., *Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals*. *Cell Stem Cell*, 2008. **3**(5): p. 519-32.
70. Shi, Y., et al., *Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses*. *Nat Neurosci*, 2012. **15**(3): p. 477-86, S1.
71. Di Lullo, E. and A.R. Kriegstein, *The use of brain organoids to investigate neural development and disease*. *Nat Rev Neurosci*, 2017. **18**(10): p. 573-584.
72. Mizutani, K. and T. Saito, *Progenitors resume generating neurons after temporary inhibition of neurogenesis by Notch activation in the mammalian cerebral cortex*. *Development*, 2005. **132**(6): p. 1295-304.
73. Rodriguez, M., et al., *Gde2 regulates cortical neuronal identity by controlling the timing of cortical progenitor differentiation*. *Development*, 2012. **139**(20): p. 3870-9.
74. Kitchens, D.L., E.Y. Snyder, and D.I. Gottlieb, *FGF and EGF are mitogens for immortalized neural progenitors*. *J Neurobiol*, 1994. **25**(7): p. 797-807.
75. Svendsen, C.N., et al., *A new method for the rapid and long term growth of human neural precursor cells*. *J Neurosci Methods*, 1998. **85**(2): p. 141-52.
76. Roskoski, R., Jr., *The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer*. *Pharmacol Res*, 2014. **79**: p. 34-74.
77. Nugent, M.A. and R.V. Iozzo, *Fibroblast growth factor-2*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2000. **32**(2): p. 115-20.
78. Newschaffer, C.J., et al., *The epidemiology of autism spectrum disorders*. *Annu Rev Public Health*, 2007. **28**: p. 235-58.
79. Lai, M.C., M.V. Lombardo, and S. Baron-Cohen, *Autism*. *Lancet*, 2014. **383**(9920): p. 896-910.

80. Frye, R.E. and D.A. Rossignol, *Identification and Treatment of Pathophysiological Comorbidities of Autism Spectrum Disorder to Achieve Optimal Outcomes*. Clin Med Insights Pediatr, 2016. **10**: p. 43-56.
81. Kumar, R.A. and S.L. Christian, *Genetics of autism spectrum disorders*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2009. **9**(3): p. 188-97.
82. Toro, R., et al., *Key role for gene dosage and synaptic homeostasis in autism spectrum disorders*. Trends Genet, 2010. **26**(8): p. 363-72.
83. Bourgeron, T., *From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder*. Nat Rev Neurosci, 2015. **16**(9): p. 551-63.
84. Nelson, S.B. and V. Valakh, *Excitatory/Inhibitory Balance and Circuit Homeostasis in Autism Spectrum Disorders*. Neuron, 2015. **87**(4): p. 684-98.
85. Durand, C.M., et al., *Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders*. Nat Genet, 2007. **39**(1): p. 25-7.
86. Leblond, C.S., et al., *Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: a gradient of severity in cognitive impairments*. PLoS Genet, 2014. **10**(9): p. e1004580.
87. Boeckers, T.M., et al., *ProSAP/Shank proteins - a family of higher order organizing molecules of the postsynaptic density with an emerging role in human neurological disease*. J Neurochem, 2002. **81**(5): p. 903-10.
88. Grabrucker, A.M., et al., *Concerted action of zinc and ProSAP/Shank in synaptogenesis and synapse maturation*. EMBO J, 2011. **30**(3): p. 569-81.
89. Kreienkamp, H.J., et al., *Interaction of G-protein-coupled receptors with synaptic scaffolding proteins*. Biochem Soc Trans, 2002. **30**(4): p. 464-8.
90. Peca, J., et al., *Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction*. Nature, 2011. **472**(7344): p. 437-42.
91. Shcheglovitov, A., et al., *SHANK3 and IGF1 restore synaptic deficits in neurons from 22q13 deletion syndrome patients*. Nature, 2013. **503**(7475): p. 267-71.
92. Yi, F., et al., *Autism-associated SHANK3 haploinsufficiency causes Ih channelopathy in human neurons*. Science, 2016. **352**(6286): p. aaf2669.
93. Torres, R.J. and J.G. Puig, *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome*. Orphanet J Rare Dis, 2007. **2**: p. 48.
94. Seegmiller, J.E., F.M. Rosenbloom, and W.N. Kelley, *Enzyme defect associated with a sex-linked human neurological disorder and excessive purine synthesis*. Science, 1967. **155**(3770): p. 1682-4.
95. Yeh, J., S. Zheng, and B.D. Howard, *Impaired differentiation of HPRT-deficient dopaminergic neurons: a possible mechanism underlying neuronal dysfunction in Lesch-Nyhan syndrome*. J Neurosci Res, 1998. **53**(1): p. 78-85.
96. Fu, R. and H.A. Jinnah, *Genotype-phenotype correlations in Lesch-Nyhan disease: moving beyond the gene*. J Biol Chem, 2012. **287**(5): p. 2997-3008.
97. Lloyd, K.G., et al., *Biochemical evidence of dysfunction of brain neurotransmitters in the Lesch-Nyhan syndrome*. N Engl J Med, 1981. **305**(19): p. 1106-11.
98. Saito, Y., et al., *Dopamine receptor upregulation in Lesch-Nyhan syndrome: a postmortem study*. Neuropediatrics, 1999. **30**(2): p. 66-71.
99. Ernst, M., et al., *Presynaptic dopaminergic deficits in Lesch-Nyhan disease*. N Engl J Med, 1996. **334**(24): p. 1568-72.
100. Wong, D.F., et al., *Dopamine transporters are markedly reduced in Lesch-Nyhan disease in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(11): p. 5539-43.
101. Haber, S.N., *The place of dopamine in the cortico-basal ganglia circuit*. Neuroscience, 2014. **282**: p. 248-57.
102. Vogt Weisenhorn, D.M., F. Giesert, and W. Wurst, *Diversity matters - heterogeneity of dopaminergic neurons in the ventral mesencephalon and its relation to Parkinson's Disease*. J Neurochem, 2016. **139** **Suppl 1**: p. 8-26.
103. Watts, R.W., *Defects of tetrahydrobiopterin synthesis and their possible relationship to a disorder of purine metabolism (the Lesch-Nyhan syndrome)*. Adv Enzyme Regul, 1985. **23**: p. 25-58.
104. Deutsch, S.I., et al., *Hypothesized deficiency of guanine-based purines may contribute to abnormalities of neurodevelopment, neuromodulation, and neurotransmission in Lesch-Nyhan syndrome*. Clin Neuropharmacol, 2005. **28**(1): p. 28-37.
105. Mastrangelo, L., et al., *Purinergic signaling in human pluripotent stem cells is regulated by the housekeeping gene encoding hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(9): p. 3377-82.
106. Torres, R.J., et al., *A review of the implication of hypoxanthine excess in the physiopathology of Lesch-Nyhan disease*. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2016. **35**(10-12): p. 507-516.

107. Ceballos-Picot, I., et al., *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase regulates early developmental programming of dopamine neurons: implications for Lesch-Nyhan disease pathogenesis*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(13): p. 2317-27.
108. Guibinga, G.H., S. Hsu, and T. Friedmann, *Deficiency of the housekeeping gene hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) dysregulates neurogenesis*. Mol Ther, 2010. **18**(1): p. 54-62.
109. Kang, T.H., et al., *HPRT deficiency coordinately dysregulates canonical Wnt and presenilin-1 signaling: a neuro-developmental regulatory role for a housekeeping gene?* PLoS One, 2011. **6**(1): p. e16572.
110. Kang, T.H., et al., *The housekeeping gene hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) regulates multiple developmental and metabolic pathways of murine embryonic stem cell neuronal differentiation*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e74967.
111. Luo, S.X. and E.J. Huang, *Dopaminergic Neurons and Brain Reward Pathways: From Neurogenesis to Circuit Assembly*. Am J Pathol, 2016. **186**(3): p. 478-88.
112. Tang, M., et al., *Interactions of Wnt/beta-catenin signaling and sonic hedgehog regulate the neurogenesis of ventral midbrain dopamine neurons*. J Neurosci, 2010. **30**(27): p. 9280-91.
113. Hegarty, S.V., A.M. Sullivan, and G.W. O'Keefe, *Midbrain dopaminergic neurons: a review of the molecular circuitry that regulates their development*. Dev Biol, 2013. **379**(2): p. 123-38.
114. Simeone, A., et al., *Otx genes in neurogenesis of mesencephalic dopaminergic neurons*. Dev Neurobiol, 2011. **71**(8): p. 665-79.
115. Prakash, N. and W. Wurst, *Development of dopaminergic neurons in the mammalian brain*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(2): p. 187-206.
116. Wurst, W. and N. Prakash, *Wnt1-regulated genetic networks in midbrain dopaminergic neuron development*. J Mol Cell Biol, 2014. **6**(1): p. 34-41.
117. Arenas, E., M. Denham, and J.C. Villaescusa, *How to make a midbrain dopaminergic neuron*. Development, 2015. **142**(11): p. 1918-36.
118. Palfi, S., et al., *Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial*. Lancet, 2014. **383**(9923): p. 1138-46.
119. Muntoni, F., S. Torelli, and A. Ferlini, *Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes*. Lancet Neurol, 2003. **2**(12): p. 731-40.
120. Doorenweerd, N., et al., *Timing and localization of human dystrophin isoform expression provide insights into the cognitive phenotype of Duchenne muscular dystrophy*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 12575.
121. Smith, R.A., J.R. Sibert, and P.S. Harper, *Early development of boys with Duchenne muscular dystrophy*. Dev Med Child Neurol, 1990. **32**(6): p. 519-27.
122. Bresolin, N., et al., *Cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy*. Neuromuscul Disord, 1994. **4**(4): p. 359-69.
123. Wicksell, R.K., et al., *Specific cognitive deficits are common in children with Duchenne muscular dystrophy*. Dev Med Child Neurol, 2004. **46**(3): p. 154-9.
124. Pane, M., et al., *Early neurodevelopmental assessment in Duchenne muscular dystrophy*. Neuromuscul Disord, 2013. **23**(6): p. 451-5.
125. Hendriksen, J.G. and J.S. Vles, *Neuropsychiatric disorders in males with duchenne muscular dystrophy: frequency rate of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), autism spectrum disorder, and obsessive-compulsive disorder*. J Child Neurol, 2008. **23**(5): p. 477-81.
126. Pane, M., et al., *Duchenne muscular dystrophy and epilepsy*. Neuromuscul Disord, 2013. **23**(4): p. 313-5.
127. Banihani, R., et al., *Cognitive and Neurobehavioral Profile in Boys With Duchenne Muscular Dystrophy*. J Child Neurol, 2015. **30**(11): p. 1472-82.
128. Doorenweerd, N., et al., *Reduced cerebral gray matter and altered white matter in boys with Duchenne muscular dystrophy*. Ann Neurol, 2014. **76**(3): p. 403-11.
129. Lee, J.S., et al., *Altered regional brain glucose metabolism in Duchenne muscular dystrophy: a pet study*. Muscle Nerve, 2002. **26**(4): p. 506-12.
130. Taylor, P.J., et al., *Dystrophin gene mutation location and the risk of cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8803.
131. Ricotti, V., et al., *Neurodevelopmental, emotional, and behavioural problems in Duchenne muscular dystrophy in relation to underlying dystrophin gene mutations*. Dev Med Child Neurol, 2016. **58**(1): p. 77-84.
132. Boyce, F.M., et al., *Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(4): p. 1276-80.
133. McGreevy, J.W., et al., *Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy*. Dis Model Mech, 2015. **8**(3): p. 195-213.

134. Le Rumeur, E., S.J. Winder, and J.F. Hubert, *Dystrophin: more than just the sum of its parts*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1804**(9): p. 1713-22.
135. Hendriksen, R.G., et al., *Dystrophin Distribution and Expression in Human and Experimental Temporal Lobe Epilepsy*. *Front Cell Neurosci*, 2016. **10**: p. 174.
136. Vaillend, C. and R. Chaussenot, *Relationships linking emotional, motor, cognitive and GABAergic dysfunctions in dystrophin-deficient mdx mice*. *Hum Mol Genet*, 2017. **26**(6): p. 1041-1055.
137. Fort, P.E., et al., *Kir4.1 and AQP4 associate with Dp71- and utrophin-DAPs complexes in specific and defined microdomains of Muller retinal glial cell membrane*. *Glia*, 2008. **56**(6): p. 597-610.
138. Benabdesselam, R., et al., *A deficit of brain dystrophin 71 impairs hypothalamic osmostat*. *J Neurosci Res*, 2010. **88**(2): p. 324-34.
139. Tadayoni, R., et al., *Dystrophin Dp71: the smallest but multifunctional product of the Duchenne muscular dystrophy gene*. *Mol Neurobiol*, 2012. **45**(1): p. 43-60.
140. Giocanti-Auregan, A., et al., *Altered astrocyte morphology and vascular development in dystrophin-Dp71-null mice*. *Glia*, 2016. **64**(5): p. 716-29.
141. Daoud, F., et al., *Role of mental retardation-associated dystrophin-gene product Dp71 in excitatory synapse organization, synaptic plasticity and behavioral functions*. *PLoS One*, 2008. **4**(8): p. e6574.
142. Miranda, R., et al., *Altered presynaptic ultrastructure in excitatory hippocampal synapses of mice lacking dystrophins Dp427 or Dp71*. *Neurobiol Dis*, 2011. **43**(1): p. 134-41.
143. Morris, G.E., C. Simmons, and T.M. Nguyen, *Apo-dystrophins (Dp140 and Dp71) and dystrophin splicing isoforms in developing brain*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. **215**(1): p. 361-7.
144. Denis, J.A., et al., *mTOR-dependent proliferation defect in human ES-derived neural stem cells affected by myotonic dystrophy type 1*. *J Cell Sci*, 2013. **126**(Pt 8): p. 1763-72.
145. Quartier, A., et al., *Genes and Pathways Regulated by Androgens in Human Neural Cells, Potential Candidates for the Male Excess in Autism Spectrum Disorder*. *Biol Psychiatry*, 2018.
146. Pane, M., et al., *Attention deficit hyperactivity disorder and cognitive function in Duchenne muscular dystrophy: phenotype-genotype correlation*. *J Pediatr*, 2012. **161**(4): p. 705-9 e1.
147. Lauschke, K., L. Frederiksen, and V.J. Hall, *Paving the Way Toward Complex Blood-Brain Barrier Models Using Pluripotent Stem Cells*. *Stem Cells Dev*, 2017. **26**(12): p. 857-874.
148. Imamura, M. and E. Ozawa, *Differential expression of dystrophin isoforms and utrophin during dibutyryl-cAMP-induced morphological differentiation of rat brain astrocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(11): p. 6139-44.
149. Haenggi, T., et al., *The role of utrophin and Dp71 for assembly of different dystrophin-associated protein complexes (DPCs) in the choroid plexus and microvasculature of the brain*. *Neuroscience*, 2004. **129**(2): p. 403-13.
150. Goodnough, C.L., et al., *Lack of dystrophin results in abnormal cerebral diffusion and perfusion in vivo*. *Neuroimage*, 2014. **102 Pt 2**: p. 809-16.
151. Doorenweerd, N., et al., *Decreased cerebral perfusion in Duchenne muscular dystrophy patients*. *Neuromuscul Disord*, 2017. **27**(1): p. 29-37.

V- ANNEXES: Articles décrits dans ce mémoire

Article 1:

MiR-125 potentiates early neural specification of human embryonic stem cells.

Boissart C, Nissan X, Giraud-Triboult K, Peschanski M, Benchoua A.
Development. 2012.

Article 2:

Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening.

Boissart C, Poulet A, Georges P, Darville H, Julita E, Delorme R, Bourgeron T, Peschanski M, Benchoua A.
Translational Psychiatry. 2013

Article 3:

Protein Kinase-A Inhibition Is Sufficient to Support Human Neural Stem Cells Self-Renewal

Georges P, Boissart C, Poulet A, Peschanski M, Benchoua A.
Stem Cells. 2015

Article 4:

Human Pluripotent Stem Cell-derived Cortical Neurons for High Throughput Medication Screening in Autism: A Proof of Concept Study in SHANK3 Haploinsufficiency Syndrome.

Darville H, Poulet A, Rodet-Amsellem F, Chatrousse L, Pernelle J, Boissart C, Héron D, Nava C, Perrier A, Jarrige M, Cogé F, Millan MJ, Bourgeron T, Peschanski M, Delorme R, Benchoua A.
EBioMedicine. 2016

ARTICLE 1

Development 139, 1247-1257 (2012) doi:10.1242/dev.073627
 © 2012. Published by The Company of Biologists Ltd

miR-125 potentiates early neural specification of human embryonic stem cells

Claire Boissart^{1,2,3}, Xavier Nissan^{1,2,3}, Karine Giraud-Triboulet^{1,2,3}, Marc Peschanski^{1,2} and Alexandra Benchoua^{1,2,3,*}

SUMMARY

The role of microRNAs (miRNAs) as coordinators of stem cell fate has emerged over the last decade. We have used human embryonic stem cells to identify miRNAs involved in neural lineage commitment induced by the inhibition of TGF β -like molecule-mediated pathways. Among several candidate miRNAs expressed in the fetal brain, the two isoforms of miR-125 alone were detected in a time window compatible with a role in neural commitment *in vitro*. Functional analysis indicated that miR-125 isoforms were actively involved in the promotion of pluripotent cell conversion into SOX1-positive neural precursors. miR-125 promotes neural conversion by avoiding the persistence of non-differentiated stem cells and repressing alternative fate choices. This was associated with the regulation by miR-125 of SMAD4, a key regulator of pluripotent stem cell lineage commitment. Activation of miR-125 was directly responsive to the levels of TGF β -like molecules, placing miR-125 at the core of mechanisms that lead to the irreversible neural lineage commitment of pluripotent stem cells in response to external stimuli.

KEY WORDS: Human pluripotent stem cells, Neural commitment, MicroRNA

INTRODUCTION

The formation of early embryonic tissues is the result of a tightly controlled sequence of events that associates environmental signals and intracellular molecular mechanisms. The cellular environment, or niche, plays an instrumental role, in particular via secreted molecules that coax progenitors or stem cells toward a specific lineage. In the neural system, the earliest precursor cells are found in the neuroectoderm, a tissue that derives from the central part of the primitive ectoderm just after the appearance during gastrulation of mesodermal structures called organizers, which include the notochord (Harland, 2000). Noggin, an antagonist of the bone morphogenetic protein (BMP) receptors, was one of the first instructive secreted proteins identified as being crucial for the formation of neuroectoderm. Noggin is secreted by the cells of the notochord and, by blocking BMP-dependent pathways, induces the surrounding ectodermal cells to adopt a more specialized neural fate, which culminates in the formation of the neural plate (Lamb et al., 1993; Zimmerman et al., 1996).

It has recently emerged that inhibition of BMP-dependent pathways by their endogenous inhibitors noggin, follistatin or chordin, is not sufficient to completely induce neuralization in vertebrates. A wider blockage of the pathways that activate the transcription factors of the Smad family is required. Recently, Chambers and collaborators (Chambers et al., 2009) have shown that dual inhibition of both the activin/nodal and BMP pathways, the two canonical Smad-dependant pathways, is necessary to promote the early neural commitment of human embryonic stem cells (hESCs). However, the pathways initiated by these secreted molecules that, next to classical transcription factors, can further synchronize neural lineage entry remain to be identified.

Small non-coding RNAs of the microRNA (miRNA) family have been identified in recent years as key regulators of embryonic development (Chua et al., 2009; Fineberg et al., 2009) and represent particularly attractive candidates for regulating neural commitment. One clear role that has been identified for miRNAs is that of facilitating the coordinated phenotypic transitions that govern stem cell differentiation by blocking alternative cell fate choices or by participating in negative-feedback loops (Rybak et al., 2008). Although miRNAs appear to be plausible players in the earliest steps of nervous system formation, to date a requirement for any particular miRNA during the neural commitment of human pluripotent cells has not been reported. *In vivo* experiments employing miRNA ablation or overexpression as neural commitment proceeds in the embryo are particularly difficult to conduct and to interpret because they often lead to severe phenotypes and, in some cases, to early embryonic lethality. For evident ethical reasons, they are impossible to conduct in human embryos.

Thus, hESCs offer the unique possibility of modeling *in vitro* the first stages of neurulation (Chambers et al., 2009; Lowell et al., 2006) and assessing the involvement of miRNAs that have been described in rodent embryonic neural tissues and that constitute putative candidates for synchronizing human neural commitment. In the present study, we focused on a discrete set of miRNAs, namely miR-9, miR-124 and the two isoforms miR-125a and miR-125b (Cao et al., 2007; Sempere et al., 2004; Smirnova et al., 2005; Wulczyn et al., 2007), that were candidates for linking the extracellular signals required for neural commitment with the triggering of a genetic program of neuralization owing to their high level of expression in the neural tube of early rodent embryos.

MATERIALS AND METHODS

hESC culture

hESCs used in this study were from the H9 line (WA09, Wicell, Madison, WI, USA). hESCs were maintained on a layer of mitotically inactivated murine embryonic STO fibroblasts for a variable number of passages. Manual dissection, rather than enzymatic methods, was routinely used to passage the cells. The hESCs were cultured in DMEM/F12 glutamax

¹INSERM U861, ²UEVE U861 and ³CECS, I-Stem, AFM, Evry Cedex France.

*Author for correspondence (abenchoua@istem.fr)

supplemented with 20% knockout serum replacement, 1 mM non-essential amino acids, 1% penicillin/streptomycin, 0.55 mM 2-mercaptoethanol and 5 ng/ml recombinant human FGF2 (all from Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Cultures were fed daily and passaged every 5-7 days. To study the effect of pre-miR complexes under pluripotency conditions, hESCs were plated on Matrigel (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) in hESC medium preconditioned by feeders for 16 hours.

hESC neural differentiation and treatment with antagonists or inhibitors

Neural differentiation was performed as described (Lowell et al., 2006) with some modifications. hESC cultures were washed once in PBS then the hESC medium was changed for differentiation medium composed of N2B27 medium (Ying et al., 2003) supplemented with FGF2 (5 ng/ml). hESCs were manually detached from the feeder layer, collected in N2B27 and transferred to a low-attachment Petri dish in order to fully remove them from the influence of the feeders. Cells were finally seeded on tissue culture multi-well plates coated with poly-ornithine and laminin (Sigma, St Louis, MO, USA). The ROCK inhibitor Y27632 (Calbiochem, San Diego, CA, USA) was used at 10 μ M at the time of plating to optimize cell survival and seeding. The differentiation medium was changed after 24 hours, then every other day. Where indicated, human recombinant noggin (300 ng/ml; Peprotech, London, UK) and SB431542 (20 μ M; Tocris Biosciences, Ellisville, MO, USA) were added from day 0, then in every medium change. Activin A and BMP4 were both from R&D Systems and used at 10 ng/ml.

Immunostaining

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) and incubated for 10 minutes in blocking buffer (PBS containing 3% goat serum and 0.1% Triton X-100). Primary antibodies (supplementary material Table S2) were diluted in blocking buffer and applied overnight at 4°C. After three washes in PBS, secondary antibodies conjugated to Alexa fluorophores (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) were diluted 1:1000 in blocking buffer and applied for 2 hours at room temperature. The cells were washed at least three times in PBS and visualized on an Axiovert inverted fluorescence microscope (Carl Zeiss, LePecq, France). Image acquisition was performed using AxioVision LE software (Carl Zeiss). For nuclear counterstaining, cells were incubated in 10 μ g/ml DAPI (Sigma) for 10 minutes after immunostaining.

Flow cytometry (FACS)

Cells were trypsinized for 5 minutes and 10% fetal bovine serum added to stop the reaction. The cells were collected and washed by resuspension in PBS and centrifugation at 1500 *g* for 10 minutes. Cells were fixed in 200 μ l freshly prepared 2% PFA for 10 minutes on ice, washed by centrifugation and permeabilized with 0.1% saponin. After centrifugation, cells were incubated for 1 hour at room temperature in 200 μ l primary antibody as described in supplementary material Table S2. Cells were washed and incubated for 30 minutes at room temperature with Alexa Fluor 488-coupled anti-isotype antibodies. FACS-based counting was performed on a FACScalibur analyzer using CellQuest software (BD Bioscience). Proper gating, compensations and exclusion of autofluorescent cells were performed using several control conditions, which included cells probed with Alexa Fluor 488-coupled secondary antibodies only and isotype-related non-fluorescent antibodies.

Quantitative RT-PCR (qPCR)

Total RNA was isolated using an RNeasy Mini extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocol, and 500 ng used for reverse transcription using Superscript III (Invitrogen). PCR primers are listed in supplementary material Table S1. qPCR assays included 1 μ M each primer and 12.5 ng cDNA in SYBR Green PCR Master Mix (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). PCR reactions were performed on an ABI 7900 light cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Quantification of gene expression was based on the Δ Ct method and normalized to 18S rRNA (*RN18S1*) housekeeping gene levels. RNAs isolated from pooled human fetal brains, aged from 20 to 33 weeks, were obtained from Clontech (Clontech Laboratories,

Mountain view, CA, USA). Melting curve and electrophoresis analysis were performed to control PCR product specificities and exclude non-specific amplification.

miRNA extraction and TaqMan assay

miRNAs were extracted using the miRvana extraction kit (Ambion, Austin, TX, USA) according to the manufacturer's instructions after a phenol-chloroform purification step. They were reverse transcribed and prepared for qPCR using the TaqMan miRNA reverse transcriptase kit and miRNA-specific stem-loop primers (Applied Biosystems). An individual TaqMan miRNA assay was performed on the ABI 7900 with a no-Amperase UNG Master Mix. Data were analyzed with SDS relative quantification software (Applied Biosystems) with an automatic Ct setting for assigning threshold and baseline for Ct determination. Results were normalized against *RNU48* (*SNORD48* – Human Gene Nomenclature Committee) small nucleolar RNA.

Transfection of hESCs with antago-miR or pre-miR-125 complexes

Neural induction was initiated as described above. After 24 hours, cells were transfected with 20 nM antago-miR or pre-miR-125 complexes using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen). Cells were exposed to the transfection complexes for 16 hours before the first medium change. Western blot analyses of Smad protein levels were performed 48 hours after this medium change, and immunocytochemistry and qPCR analyses were performed at day 7. Non-targeting antago-miR or pre-miR complexes were used as controls. In addition, a non-targeting antago-miR linked to Cy3 was used to evaluate the efficiency of transfection. All antago-miR and pre-miR complexes were from Ambion.

Co-transfection of antago-miR complexes with siRNA was as described previously (Ma et al., 2010). Clusters of hESCs were co-transfected with antago-miR complexes and 15 μ M *SMAD4* siRNA or non-targeting siRNA (Ambion) using Lipofectamine RNAiMAX, then seeded on laminin-coated culture dishes with or without SB431542 and noggin.

Luciferase reporter assay

Plasmids containing the 3'UTR of human *SMAD4* or of human beta-actin (*ACTB*) downstream of the gene encoding the *Renilla* luciferase were obtained from Switchgear Genomics (Menlo Park, CA, USA). HEK cells were seeded in 96-well plates at a density of 25,000 cells per cm². Twenty-four hours post-plating, 80 ng plasmid was co-transfected in each well with 10 pmoles pre-miR complexes using DharmaFECT Duo reagent (Dharmacon, Lafayette, CO, USA) following the manufacturer's instructions and with 20 ng of a plasmid lacking any 3'UTR but expressing the firefly luciferase. Forty-eight hours post-transfection, the EnduRen kit from Promega was used to detect *Renilla* luciferase activity without lysing the cells. After this first reading on an Analyst GT luminometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), the cells were washed, lysed and the activity of the firefly luciferase was detected using Steady-Glo luciferase assay reagent (Promega). The signal obtained from the firefly luciferase activity of the plasmid lacking any 3'UTR was used to normalize the signals obtained with the 3'UTR-containing constructs in order to track equal transfection efficiency in wells. Each 3'UTR/miR combination was analyzed in quadruplicate.

Western blot analysis

Cells were trypsinized and collected by centrifugation (1000 *g*, 10 minutes). The pellets were incubated on ice in lysis buffer [150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8.0, 5 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.5% protease inhibitor cocktail (Sigma)]. Homogenates were centrifuged, supernatants were collected and stored at -80°C. Protein concentrations were determined with the BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA). Proteins (10 μ g) were resolved on a 10% NuPAGE SDS-PAGE gel (Invitrogen) and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes. The membranes were incubated with anti-Smad antibodies (Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA) at 1/1000 in 5% non-fat dry milk in TBS (100 mM NaCl, 10 mM Tris base pH 7.5) containing 0.1% Tween 20 (T-TBS) overnight at 4°C. After 1 hour incubation with anti-rabbit IgG HRP-coupled secondary antibodies, antigens were revealed using ECL reagents (Amersham Pharmacia Biotechnology, Les Ulis, France). Blots were

routinely stripped in a denaturing solution (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 0.8% beta-mercaptoethanol), and reprobed with anti-beta-actin coupled to HRP (Sigma) in order to confirm equal loading.

Statistics

All experiments were carried out independently at least three times with triplicates included in each experiment. Error bars represent s.d. Statistical significance was estimated with an ANOVA test and *P*-values were calculated using Student's *t*-test.

RESULTS

Timecourse of hESC neural commitment following treatment by noggin and SB431542

The combined effects of noggin and SB431542, which are both inhibitors of TGF β -like molecules, as shown by Chambers et al. (Chambers et al., 2009) were confirmed under conditions in which the levels of TGF β -like molecules were optimally lowered in the culture medium (Lowell et al., 2006), using N2B27 medium in combination with laminin instead of knockout serum replacement-supplemented medium and Matrigel, and avoiding the first step of

culture in feeder cell-conditioned medium. Cultures treated with the two inhibitors homogeneously expressed the early neural marker PAX6 as well as SOX2. By contrast, when the inhibitors were omitted, expression of the ESC marker OCT4 (POU5F1 – Human Gene Nomenclature Committee) persisted and numerous non-neural cells (PAX6⁻ SOX2⁻) appeared (Fig. 1A). FACS analyses of nestin and SOX1 were performed (Fig. 1B,C), in addition to OCT4 and SOX2 (supplementary material Fig. S1), to allow hESCs (OCT4⁺ SOX2⁺) to be differentiated from early neural precursor cells (OCT4⁻ SOX2⁺) and other lineages (OCT4⁻ SOX2⁻) (Lowell et al., 2006). This indicated that efficient neural induction (over 80%) was obtained over 8 days using noggin and SB431542, whereas differentiation in N2B27 alone remained suboptimal.

A timecourse analysis using qPCR showed that pluripotency markers decreased rapidly between days 2 and 5 of the treatment with noggin and SB431542 (Fig. 1D). Conversely, expression of the neural markers *PAX6* and *SOX1* was initiated between day 2 and day 5. Immunocytochemistry (Fig. 1E) and FACS analyses (Fig. 2D) confirmed this sequence of phenotypic changes at the cellular level. Altogether, these results confirmed an efficient and

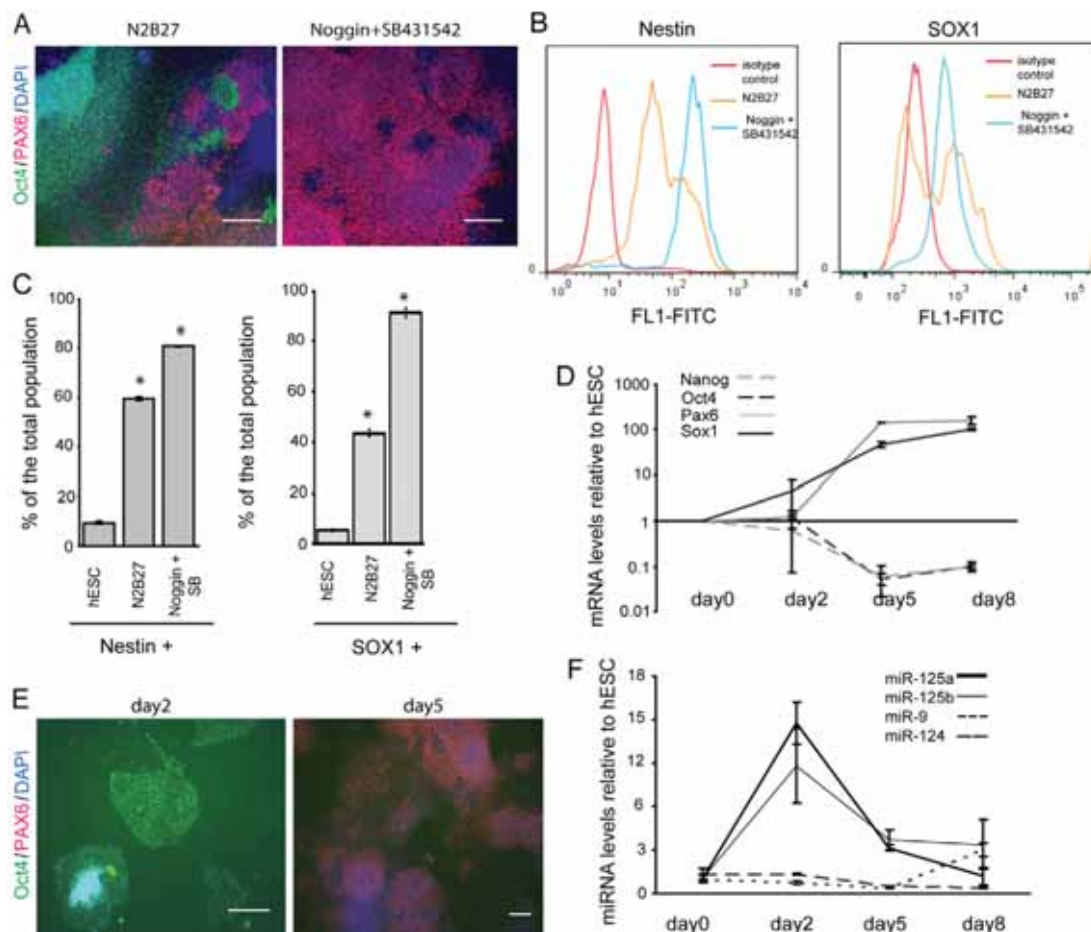


Fig. 1. Timecourse of the neural conversion of hESCs after treatment with noggin and SB431542. (A) Qualitative analysis of the effect of noggin and SB431542 by immunocytochemistry using OCT4 to label hESCs (green) combined with labeling for the pro-neural gene PAX6 (red). (B,C) The efficiency of neural conversion of hESCs into neuroepithelial precursors following 8 days of treatment with noggin and SB431542 was monitored by FACS. SOX1 and nestin were chosen as markers of neural lineage-committed cells. (B) Representative FACS profiles. (C) Quantitative analyses of the percentage of cells expressing each marker. **P*<0.01, two-tailed Student's *t*-test. Error bars indicate s.d. (D) Expression of genes representative of the neural lineage (*PAX6* and *SOX1*) or of pluripotent and undifferentiated cells (*OCT4* and *NANOG*) was monitored over time by qPCR and indicated that the neural commitment decision occurred between day 2 and day 5 post-treatment. (E) This was confirmed by immunocytochemistry for PAX6 and OCT4. (F) The timecourse expression of selected miRNAs was analyzed using TaqMan assays following the treatment of hESCs with noggin and SB431542 and normalized to the expression measured in pluripotent hESCs. Scale bars: 100 μ m.

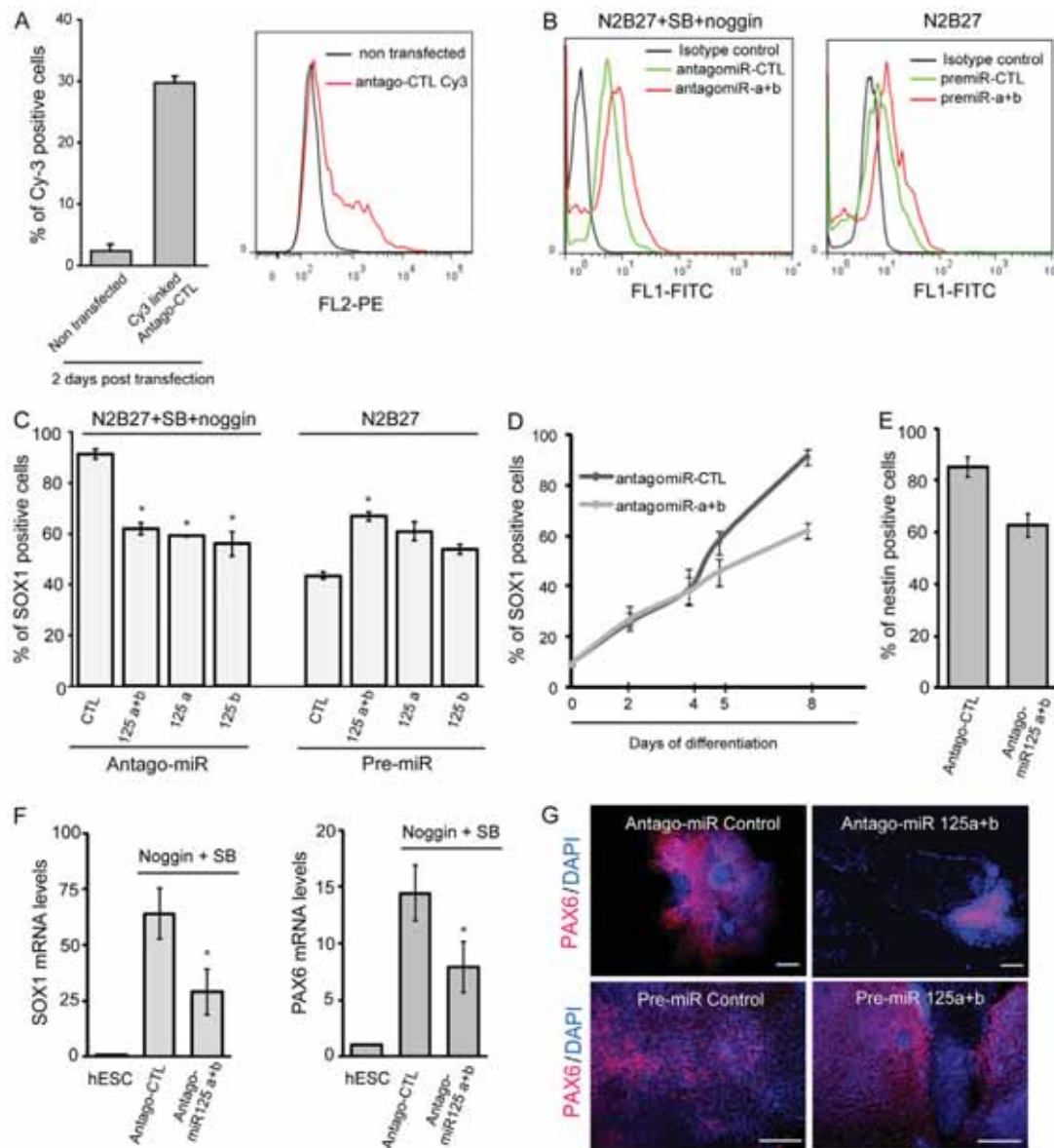


Fig. 2. miR-125 isoforms promote neural conversion of hESCs. The functional involvement of miR-125 in the promotion of the neural conversion of hESCs was investigated using antago-miR or pre-miR complexes. (A) The efficiency of transfection of hESCs with antago-miR complexes was quantified 2 days after transfection using a non-targeting antago-miR linked to Cy3. (B-D) Functional consequences of antago-miR and pre-miR transfections were analyzed by FACS using SOX1 as a marker of neural commitment. (B) Representative FACS profiles of the SOX1-labeled population in hESCs transfected with antago-miR or pre-miR control (CTL) or with antago-miR or pre-miR complexes targeting miR-125a and miR-125b (a+b). (C) Quantification of the functional effect of each miR-125 isoform manipulation after 7 days of differentiation. (D) FACS quantification of the functional effect of the inactivation of both miR-125 isoforms as neural commitment proceeds indicated that miR-125 expression was necessary to fully achieve neural commitment. (E) Quantification of the number of nestin-positive cells after antago-miR treatment. (F) *SOX1* and *PAX6* mRNA quantified by qPCR 7 days after antago-miR treatment. (G) *PAX6* protein expression visualized by immunocytochemistry 7 days after antago-miR or pre-miR treatment. * $P < 0.05$, one-tailed Student's *t*-test compared with CTL miR complexes. Error bars indicate s.d. Scale bars: 100 μ m.

homogeneous conversion of hESCs into neural precursors upon treatment with the two inhibitors and pointed to the day 2-5 time window as the crucial period for cell fate decision.

Activation of miRNAs following noggin and SB431542 treatment

This induction paradigm, and particularly its precise schedule, was used to examine the selective involvement of miRNAs in early neural commitment. Three miRNAs, miR-9, miR-124 and miR-

125, were selected because of their high expression in the developing nervous system of the mouse (Sempere et al., 2004). Because no relevant information was available for human, high and selective expression of miR-9, miR-124 and the two miR-125 isoforms a and b was first confirmed in the human fetal brain (supplementary material Fig. S2). As hESC neural commitment proceeded, these miRNAs displayed very different timecourses of appearance (Fig. 1F). There was no expression of miR-9 or miR-124 until day 8, pointing to a potential role beyond the time

window of cell fate decision triggered by SB431542 and noggin. Only miR-125a and miR-125b were activated during the time window of hESC commitment to the neural lineage, with the strongest expression at day 2.

miR-125 isoforms promote neural conversion of hESCs

As these experiments pointed to miR-125a and miR-125b as potential candidates for a role in early neural commitment, their functional roles were independently analyzed using antago-miR and pre-miR complexes. Transfection of hESCs with a Cy3-labeled non-targeting control antago-miR indicated that the efficiency of transfection was ~30% after 2 days (Fig. 2A). The efficiency with which antago-miRs silence their respective targets was checked using a TaqMan-based miRNA detection system (supplementary material Fig. S3A). The efficiency with which pre-miRs induce an increase in their respective miRNA expression was also tracked using the same system (supplementary material Fig. S3B).

Antagonizing the action of either miR-125a or miR-125b independently, or both in combination, compromised to the same extent the efficiency of neural induction as quantified by SOX1-expressing cells 8 days after transfection (Fig. 2B,C), indicating that both isoforms were actively involved. Timecourse experiment showed that the reduction in the efficiency of neural differentiation induced by inactivation of both miR-125 isoforms was not detectable before day 5, with the strongest effect at day 8 (Fig. 2D) when the cells normally reach the full neural phenotype (Fig. 1A,B). This reduction of neural induction efficiency was confirmed using nestin as a neural marker (Fig. 2E). Accordingly, the mRNA levels of *SOX1* and *PAX6* were strongly reduced following treatment with antago-miR (Fig. 2F) and immunocytochemistry confirmed the presence in the cell cultures of areas that were negative for the neural marker PAX6 (Fig. 2G).

Mirror experiments analyzing neural conversion under conditions of forced expression of miR-125 isoforms in suboptimal conditions (i.e. without noggin and SB 431542 in the medium) provided exactly the opposite results. SOX1-positive cells were more numerous than in untreated controls when the expression of each isoform was induced independently, and maximal neural induction efficiency was obtained when the two pre-miR complexes were transfected together (Fig. 2B,C). Promotion of neural induction under those conditions was confirmed by PAX6 immunocytochemistry (Fig. 2G).

In order to determine whether overexpression of miR-125 was sufficient to initiate neural differentiation in cells maintained under pluripotency-promoting conditions, hESCs were transfected with both pre-miR-125 isoforms and grown on Matrigel in hESC medium preconditioned by feeder cells for at least 16 hours (Fig. 3). After 8 days of culture, most cells remained undifferentiated regardless of whether they had been transfected with pre-miR-125, indicating that the forced expression of miR-125 was not sufficient to bypass the pluripotency signals.

miR-125 activation is modulated by extracellular levels of activin and BMP4

The activation of each miR-125 isoform was measured after 2 days of treatment with either noggin or SB431542, or both in combination, in order to investigate their roles more specifically (Fig. 4A). Strikingly, the expression of miR-125a and miR-125b was only strongly induced when the two inhibitors were used together, indicating that inhibition of both the activin-dependent and BMP-dependent signaling pathways was required to efficiently

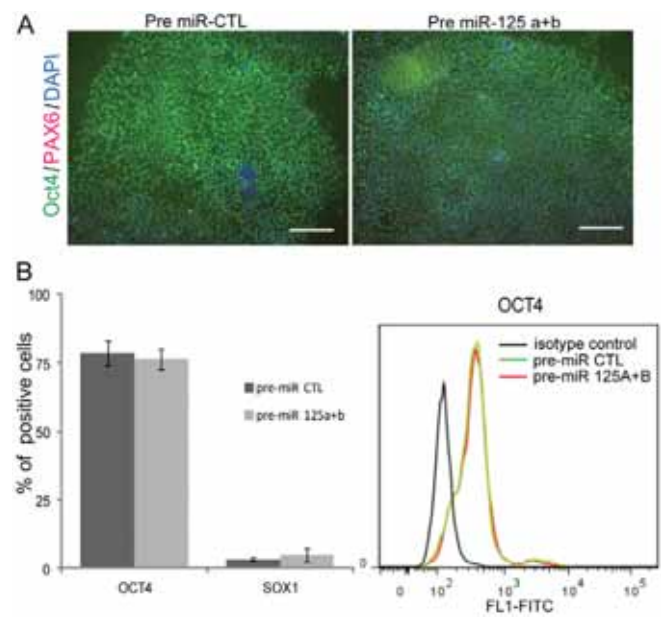


Fig. 3. Forced expression of miR-125 is not sufficient to bypass pluripotency signals. hESCs were transfected using non-targeting pre-miR complexes (pre-miR CTL) or pre-miR complexes targeting both isoforms of miR-125 (pre-miR a+b) and cultivated under culture conditions supporting self-renewal. The resulting phenotype was analyzed after 8 days of culture by (A) immunocytochemistry for OCT4 and PAX6 and (B) FACS using OCT4 and SOX1. Error bars indicate s.d. Scale bars: 100 μ m.

activate miR-125. This strongly suggested a physiological role for the TGF β -like molecules in the process. This was confirmed by measuring early modulations of the activation of miR-125 isoforms after 2 days of treatment with activin, BMP4, or both at days 0 and 1 after plating. Levels of miR-125 isoforms remained unchanged when either 20 ng/ml activin or 20 ng/ml BMP4 was added. By contrast, the two molecules strongly inhibited miR-125 activation when used in combination (Fig. 4B). This mirrored the effects of the two inhibitors noggin and SB431542 and pointed to miR-125 as a direct sensor of extracellular levels of TGF β -like factors. This prompted us to analyze the cell fates induced differentially by noggin or SB431542 treatment.

An 8-day treatment with SB431542 triggered the complete disappearance of OCT4⁺ pluripotent hESCs as monitored by FACS (supplementary material Fig. S4B). However, this was not accompanied by a general commitment to the neural lineage but instead by the appearance of a large number of OCT4⁻ SOX2⁻ non-neural cells. qPCR revealed high levels of the two neural crest markers *SOX10* and *SLUG* (*SNAI2* – Human Gene Nomenclature Committee) and of the two early epidermal markers *CK18* and *P63* (*KRT18* and *TP63*, respectively – Human Gene Nomenclature Committee) (supplementary material Fig. S4B). The presence of neural crest and epidermal derivatives was confirmed by immunocytochemistry for PAX3 and CK18, respectively (supplementary material Fig. S4C). Therefore, SB431542 promoted differentiation to all ectodermal cell fates and not simply to those related to the neural lineage. Conversely, the same analyses performed after noggin treatment resulted in a large number of hESCs that were resistant to differentiation, with most differentiated cells exhibiting a neural phenotype, indicating that the BMP inhibitor was not sufficient by itself to

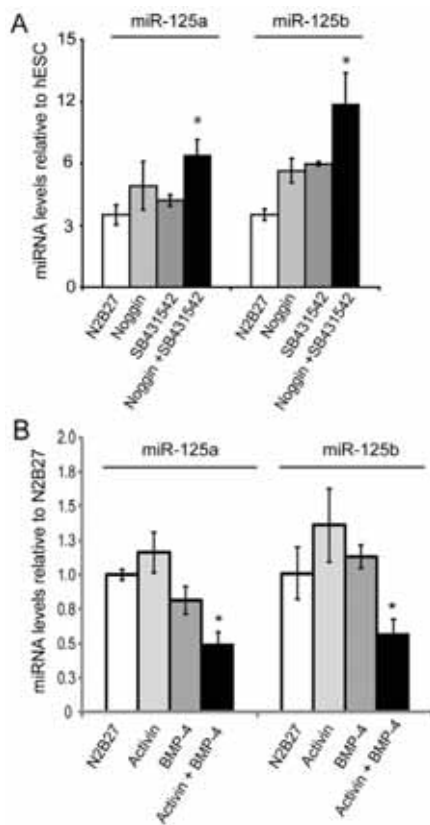


Fig. 4. The expression of miR-125 isoforms is regulated by extracellular levels of activin and BMPs. (A) The activation of miR-125 isoforms a and b was quantified using TaqMan assays following 2 days of treatment of hESCs with noggin, SB431542, or both. (B) The same experiments were performed after activin and BMP treatments. The results represent the mean \pm s.d. of three experiments. * $P < 0.01$, one-tailed Student's t -test.

induce mass differentiation, but rather blocked the emergence of non-neural ectodermal derivatives when used together with SB431542.

These results indicated that miR-125 was selectively activated in culture conditions that promote the neural fate.

The miR-125a and miR-125b isoforms promote hESC entry into the neural lineage by inhibiting alternative cell fate choices

In order to investigate how miR-125 isoforms promote neural lineage specification, neural induction was initiated with noggin and SB431542 and cells were transfected with 20 nM antago-miR-125 or pre-miR-125 complexes 24 hours later (Fig. 5A). qPCR analyses performed after 8 days of differentiation indicated that, when both isoforms were antagonized simultaneously, expression of all non-neural markers was significantly induced. This included the pluripotency markers *OCT4* and *NANOG*, the epithelial markers *CK8* (*KRT8* – Human Gene Nomenclature Committee) and *CK18*, and the neural crest markers *SOX10* and *P75* (*NGFR* – Human Gene Nomenclature Committee). These results were confirmed by immunocytochemistry, which revealed patches of *OCT4*⁺ and *CK18*⁺ cells in cultures transfected with the two antago-miRs (Fig. 5B). Altogether, these results indicated that the complementary action of the two miR-125 isoforms may promote

the exit of hESCs from pluripotency and then promote their neural lineage commitment by blocking the emergence of non-neural ectoderm derivatives.

SMAD4 is a direct target of miR-125

A target of miR-125 isoforms that could support this pro-neural role was then sought, focusing on factors commonly involved in both the BMP and TGF β signaling pathways. On the basis of the miRBase prediction algorithm (Griffiths-Jones et al., 2008), *SMAD4*, a common co-factor of the two Smad-dependent pathways activated both by TGF β and BMPs, was identified as a candidate (Fig. 6A). The functional interaction of miR-125 isoforms with the 3'UTR of *SMAD4* was evaluated using a luciferase reporter assay. HEK cells were co-transfected with a construct containing the entire 3'UTR of *SMAD4* cloned downstream of the *Renilla* luciferase gene and with pre-miR-125a, pre-miR-125b or a non-targeting pre-miR control. Transfection of the *SMAD4* 3'UTR construct with either pre-miR-125a or pre-miR-125b led to the same, significant reduction in luciferase activity, in contrast to the pre-miR control (Fig. 6B). This effect was not observed when the 3'UTR of *SMAD4* was replaced by the 3'UTR of two genes that did not contain the predicted miR-125 binding sequence: alpha-actin (*ACTA1*) and *CUGBP* (*CELF1* – Human Gene Nomenclature Committee).

To evaluate whether *SMAD4* mRNA and protein levels are directly affected by the activation of miR-125 isoforms, hESCs were transfected with either pre-miR-125a, pre-miR-125b or a non-targeting pre-miR control. Two days post-transfection, the level of *SMAD4* mRNA was analyzed by qPCR (Fig. 6C) and *SMAD4* protein by western blotting (Fig. 6D,E). Activation of each isoform alone led to a significant decrease in *SMAD4* protein levels, whereas mRNAs remained unaffected, consistent with the post-transcriptional regulation of a miRNA target. The specific targeting of *SMAD4* was further suggested by the fact that the levels of *SMAD2* and *SMAD5* were unaffected (Fig. 6E). A reverse experiment was performed using antago-miRs (Fig. 6F). Inactivation of each miR-125 isoform alone restored *SMAD4* protein levels.

Taken together, these experiments support the hypothesis that *SMAD4* is a direct target of miR-125 and that miR-125 activation in hESCs elicits a depletion of *SMAD4* protein.

The relationship between decreased expression of *SMAD4* and the progression of neural induction was then investigated. *SMAD4* protein levels were shown by western blot analysis to decrease quickly and strongly as neural commitment induced by noggin and SB431542 proceeded (Fig. 7A). *SMAD4* was then knocked down using siRNAs in hESCs. Treated cells were then placed in suboptimal conditions of neural differentiation, i.e. in N2B27 without noggin and SB431542, and their ability to exit the pluripotent compartment and to enter the neural lineage was evaluated 5 days post-transfection. In keeping with the working hypothesis, *SMAD4* knockdown cells expressed lower levels of pluripotency markers *OCT4* and *NANOG* and higher levels of the early neural markers *PAX6* and *SOX1* than untreated controls (Fig. 7B). FACS experiments using *SOX1* protein as a neural marker confirmed these results (Fig. 7C). Finally, neural induction was induced in *SMAD4*-inactivated hESCs using SB431542 plus noggin, and the effects of antago-miR-125 isoforms tested by FACS using *SOX1* and nestin proteins as neural markers (Fig. 7D). In agreement with the working hypothesis that miR-125 induces neural conversion by affecting the expression of *SMAD4*, knockdown of miR-125 did not affect

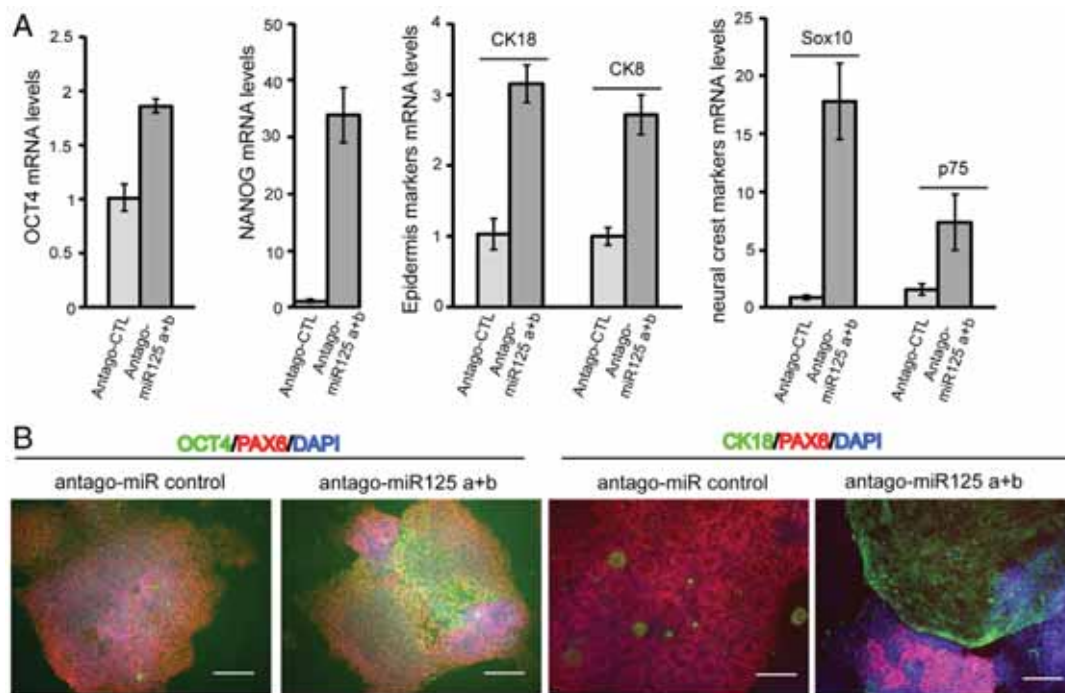


Fig. 5. miR-125 isoforms promote hESC entry into the neural lineage by the persistence of undifferentiated and inhibiting alternative cell fate choices. The effect of blockage of miR-125 isoform function was evaluated by transfecting hESCs with antago-miRs 24 hours after initiating the neural induction process with noggin and SB431542. **(A)** Levels of expression of the pluripotency markers *OCT4* and *NANOG*, the epidermal markers *CK8* and *CK18*, and the neural crest cell markers *SOX10* and *P75* were monitored by qPCR and normalized to the levels measured in cells treated with a non-targeting antago-miR (antago-CTL). The results represent the mean \pm s.d. of three experiments. **(B)** Immunocytochemistry for PAX6 (red) was performed in combination with *OCT4* or *CK18* (both in green) in cells treated with antago-miR-125a and antago-miR-125b or a non-targeting antago-miR control in the presence of noggin and SB431542. Scale bars: 100 μ m.

the neural conversion observed in SMAD4 knockdown hESCs, whereas it did decrease it significantly in SMAD4-expressing control cells.

DISCUSSION

The main result of this study is the identification of miR-125 as a key player in the molecular cascade that contributes to the irreversible commitment of pluripotent human stem cells to the neural lineage. In response to a complete inhibition of both the activin- and BMP-dependent pathways, the activity of the two miR-125 isoforms is released, promoting and securing the commitment of hESCs toward the neural lineage, at least in part by blocking the expression of SMAD4, a central regulator of ESC fate.

The role of miRNAs in the neurogenesis of early mammals has been assessed *in vivo* using mouse models in which the *Dicer1* gene has been knocked down in specific cell types, resulting in a global loss of miRNAs. These experiments have highlighted the role of miRNAs in the maintenance of a pool of neural progenitors and in the survival and homeostasis of differentiated neurons (Davis et al., 2008; Schaefer et al., 2007). However, it was difficult to investigate *in vivo* whether miRNAs were involved at an earlier developmental stage, such as in neural commitment, because inactivation of the *Dicer1* gene at an early time point leads to dramatic and lethal phenotypes.

We took the opportunity to homogeneously convert pluripotent hESCs into neuroepithelial cells using noggin and SB431542 treatment (Chambers et al., 2009) in order to identify the miRNAs

involved in the earliest stages of human neural differentiation. Timecourse analysis of representative lineage markers allowed us to define a time window of commitment between day 2 and day 5. It was assumed that the miRNAs involved in the entry of pluripotent cells into the neural lineage would be activated before or during this time window, whereas any miRNA activated later would serve to stabilize the neural phenotype or to induce terminal differentiation in neurons. Particular focus was placed on miR-9, miR-124 and miR-125 isoforms a and b because they are all expressed throughout the neural tube of the mouse, suggesting that they play a role during the early steps of nervous system formation (Smirnova et al., 2005). In fact, miR-9 and miR-124 were activated only after the time window of cell fate decision. This is in line with the well-documented roles of these two miRNAs in the homeostasis of neural stem cells and in control of the balance between self-renewal and neuronal differentiation (Delaloy et al., 2010; Packer et al., 2008), as well as in neuronal maintenance and plasticity (Makeyev et al., 2007; Visvanathan et al., 2007; Yu et al., 2008). Less has been known, to date, about the role of miR-125 during early neurogenesis, apart from its expression in the nervous system of the mouse from embryonic day 12 (Smirnova et al., 2005). We observed that the activation timecourse of the two human isoforms of miR-125 was compatible with a role in the very first stage of neural commitment of pluripotent stem cells. Functional inactivation of miR-125a and miR-125b in hESCs using specific antagonists indicated that miR-125 activation is instrumental in promoting the homogeneous and efficient entry of these cells into the neural lineage. These results were strengthened

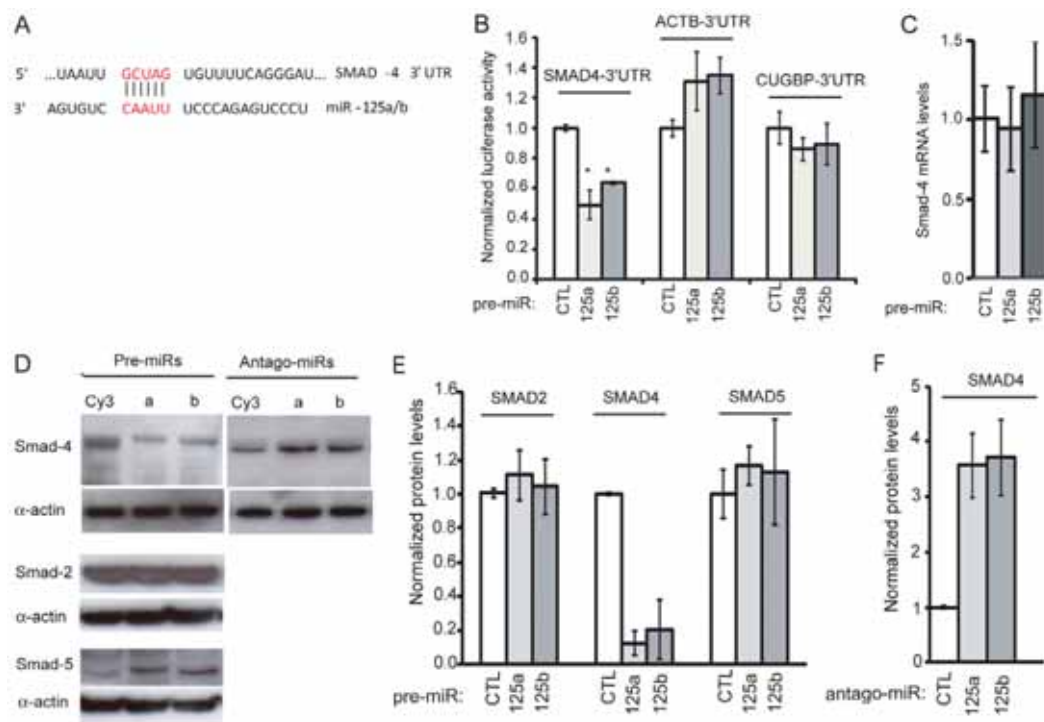


Fig. 6. miR-125 isoforms interact directly with *SMAD4* mRNA and control *SMAD4* protein expression. (A) The predicted consensus sequences (red) for miR-125a and miR-125b binding located on the 3'UTR of human *SMAD4* mRNA. (B) Pre-miR-125 complexes were co-transfected into HEK cells with luciferase reporter constructs containing the 3'UTR sequence of *SMAD4* or of two genes predicted not to be targeted by miR-125: beta-actin (*ACTB*) and the splicing factor *CUGBP*. A non-targeting pre-miR (pre-miR CTL) was used as a control. The luciferase activity was quantified 48 hours after transfection. (C) *SMAD4* mRNA levels were quantified by qPCR 48 hours after treatment of hESCs with a non-targeting pre-miR (CTL), pre-miR-125a or pre-miR-125b. (D-F) Pre-miR-125 or antago-miR-125 was transfected into hESCs and the protein levels of Smad factors quantified by western blot analysis 48 hours later. Non-targeting antago-miR or pre-miR complexes were used as controls. (D) Representative immunoblots. Quantification of protein content after pre-miR (E) or antago-miR (F) complexes was normalized to actin content. The results represent the mean \pm s.d. of three experiments. * $P < 0.01$, one-tailed Student's *t*-test.

by the fact that forced expression of these isoforms using pre-miR complexes increased the efficiency of neural conversion when the hESCs were placed in a suboptimal system lacking noggin and SB431542.

The promotion of neural conversion by miR-125 involved both the facilitation of differentiation and the repression of alternative fate choices, including non-neural ectodermal lineages. miR-125 has previously been reported, along with *let-7*, as being involved in mechanisms governing the repression of self-renewal in embryonal carcinoma cells (Rybak et al., 2008; Viswanathan et al., 2008). In these cells, miR-125 and *let-7* are targeted by the RNA-binding protein LIN28, which actively represses their maturation and activation in conditions promoting self-renewal, a mechanism that plays a role in the maintenance of the undifferentiated state. Conversely, miR-125 and *let-7* were overactivated and contributed to the downregulation of LIN28 when embryonal carcinoma cells were placed in pro-differentiating conditions, suggesting a direct role of miR-125 in repressing self-renewal and pluripotency. These mechanisms might be transposable to the hESC system, as indicated by the persistence of undifferentiated hESCs upon repression of miR-125 activity, but would not account for the additional suppressive action of miR-125 on non-neural lineages.

Smad factors were candidate targets of the effects of miR-125 because of their central role in the control of the balance between the self-renewal and differentiation of hESCs (Xu et al., 2008).

Activin-like molecules support the self-renewal of hESCs by activating the kinase domain of type-I TGF β receptors and by inducing the phosphorylation of receptor-associated SMAD2. Once phosphorylated, SMAD2 binds to SMAD4 and translocates to the nucleus to exert a pro-transcriptional activity (Shi and Massague, 2003). Conversely, members of the BMP family, such as BMP4, induce rapid differentiation of hESCs toward extra-embryonic tissues (Xu et al., 2002) and, in a dose-dependent manner, epidermis and neural crest cells (Guenou et al., 2009; Mizuseki et al., 2003). BMPs signal through the phosphorylation of SMAD1/5 proteins, which, in turn, bind to SMAD4 to form a transcriptional core (Shi and Massague, 2003).

Our working hypothesis of an action of miR-125 on the Smad-related pathways was validated in a culture system that recapitulated the variety of phenotypes driven by Smad-dependent pathways, and *SMAD4* was identified as a target of the suppressive effects of miR-125. The central role of SMAD4 in balancing the self-renewal and fate decisions of hESCs has been demonstrated by knocking down its expression using an inducible shRNA system (Avery et al., 2010). Whereas SMAD4 did not prove to be essential for the maintenance of short-term self-renewal, SMAD4 knockdown hESCs were, however, less stable and more sensitive to pro-differentiating signals. Upon differentiation, SMAD4 knockdown hESCs were not able to respond to BMP4 and had a greater propensity to differentiate toward the neural lineage than

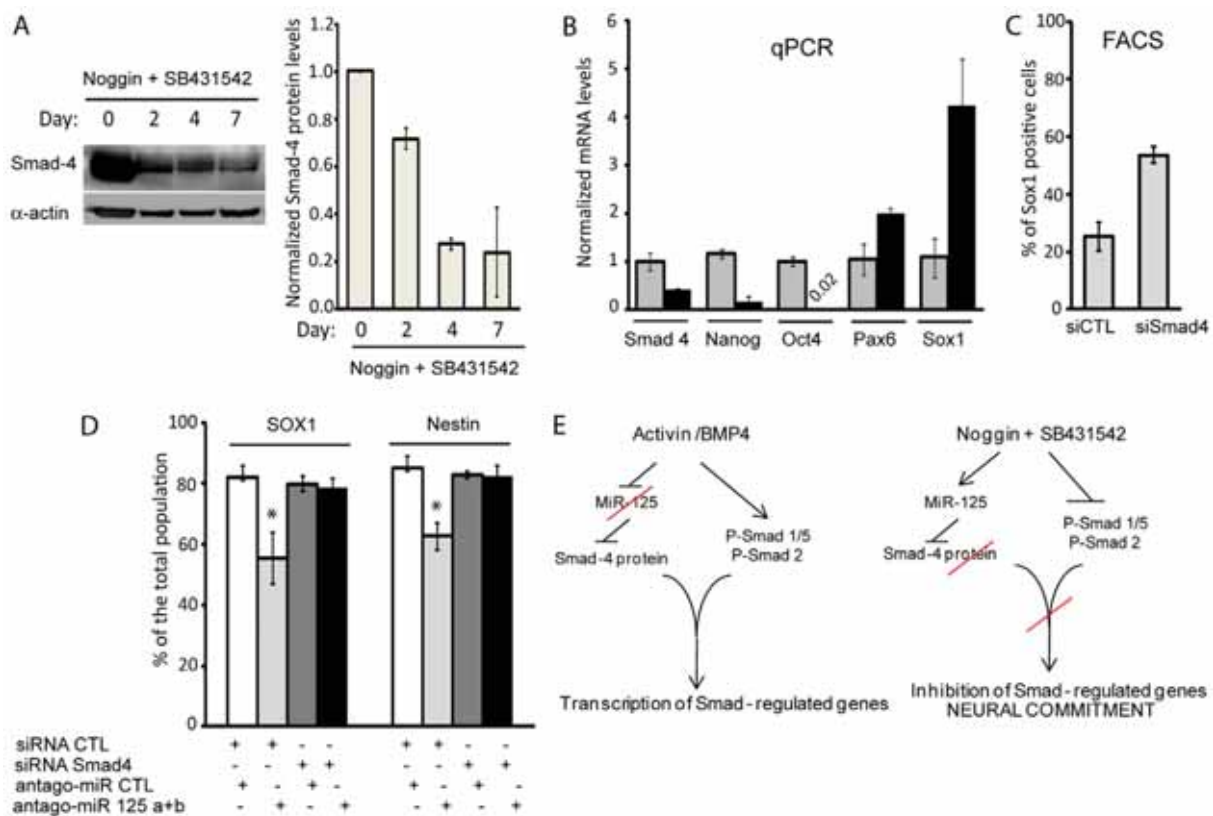


Fig. 7. Targeting of SMAD4 is instrumental in miR-125 function in promoting neural differentiation. (A) SMAD4 protein levels decrease as neural differentiation proceeds. Neural differentiation of hESCs was induced with noggin and SB431542 and the levels of SMAD4 protein were quantified over time by western blot analysis. Alpha-actin was used to ensure equal loading. The quantification of three independent experiments was carried out using ImageJ software. (B) SMAD4 knockdown cells showed a higher propensity to enter the neural lineage. siRNAs were transfected into hESCs in order to knock down SMAD4. SMAD4 knockdown hESCs were then placed in a culture medium that includes self-renewal-supporting factors (N2B27 medium without feeder cells). Expression of pluripotency genes or of key neural lineage markers was quantified 7 days after transfection by qPCR. (C) The percentage of cells expressing the neural marker SOX1 was evaluated by FACS in parallel. Cells transfected with a non-targeting control siRNA (siCTL) were used as a reference. (D) miR-125 activation is no longer necessary to control neural induction in SMAD4 knockdown cells. Neural differentiation was induced with noggin and SB431542 in hESCs co-transfected with different combinations of siRNA and antago-miR. The resulting phenotype of the cells was quantified 7 days after transfection by FACS. * $P < 0.01$, one-tailed Student's t -test compared with siRNA-CTL and antago-miR CTL-transfected hESCs. Error bars indicate s.d. (E) Model of the mechanisms by which miR-125 secures the neural lineage commitment decision by modulating the level of the central regulator SMAD4 in response to variation in levels of extracellular activin and BMP.

wild-type cells. This clearly placed SMAD4 as a central regulator of cell fate decisions and, consequently, pointed to miR-125 isoforms as major actors in those processes as they repress SMAD4 expression. The demonstration that miR-125 directly binds and represses SMAD4 points to a cell-autonomous mechanism of action. However, our study does not exclude the possibility of an additional contribution of a non-cell-autonomous effect of miR-125 on neural induction. Bystander effects of miRNAs have recently been reported, mediated either by direct transfer between neighboring cells through gap junctions (Kizana et al., 2009) or, more indirectly, by secretion of miRNAs in exosomes (Valadi et al., 2007). If this phenomenon operates in our experimental set-up, its extent and nature remain to be determined.

The activation of miR-125 isoforms in hESCs was shown in this study to be directly repressed by activin and BMPs. The mechanism at the base of miR-125 repression by activin and BMP remains to be elucidated. The fact that optimal repression was obtained when hESCs were exposed to both growth factors raises two possibilities: the stimulation of both TGF β -type

receptors might activate two different signaling pathways that act complementarily; alternatively, the same signaling pathway might be activated but optimal strength to repress miR-125 is only achieved when both types of receptor are stimulated. Activin has been identified as a key cytokine in maintaining pluripotency by controlling core pluripotency genes, including *NANOG*, *SOX2* and *OCT4* (Vallier et al., 2009). This, in turn, contributes to the high level of expression of the RNA-binding protein LIN28, a known repressor of pro-differentiation miRNAs including let-7 and miR-125 (Rybak et al., 2008). In parallel, BMPs have been shown to repress particular sets of miRNAs through activation of the JAK-STAT pathway (Sahni et al., 2010). These two complementary pathways might act together to fully repress a selected miRNA set.

Stimulation of activin or BMP receptors leads to the activation of R-Smad proteins. In addition to their role as transcription factors, R-Smads were recently highlighted as RNA-binding proteins capable of directly regulating the processing and maturation of pri-miRs within the DROSHA complex (Davis et al.,

2008). To date, only the upregulation by Smad proteins of a discrete set of 20 miRNAs, including miR-21, has been reported. Smad binding to a consensus CAGAC motif located 10 bp from the terminal loop is necessary and sufficient to promote pri-miR processing by the DROSHA complex (Davis et al., 2010). It is still not known whether R-Smad can, in parallel, repress other miRNA processing. This duality of miRNA regulation has been reported for another signaling pathway common to both activin and BMP receptors: the MAPK phosphorylation cascade. Upon activation, the MAPK pathway ultimately leads to the phosphorylation of one of the components of the miRNA-generating machinery: the HIV TAR RNA-binding protein TRBP (TARBP2). Phospho-TRBP mediates enhanced biogenesis of selected miRNAs, including many growth-promoting miRNAs, although its activation is also associated with repression of the tumor suppressive miRNA let-7 (Paroo et al., 2009). Interestingly, let-7 and miR-125 are regulated within the same feedback loop in embryonic carcinoma cells, another type of pluripotent cell (Rybak et al., 2008). One may hypothesize that the mechanism of MAPK-mediated repression highlighted for let-7 might be shared by miR-125. In addition, the MAPK signaling pathway has also been reported to directly repress miRNA transcription through activation of the transcriptional repressor RREB1 (Kent et al., 2010). It is likely that other cellular systems similarly target the miRNA pathway in order to achieve biological responses.

Molecular mechanisms suggested on the basis of our results are summarized in Fig. 7E. According to this scheme, the presence of activin and BMP4 in the culture medium totally blocks the activity of the miR-125 isoforms and promotes significant levels of SMAD4 expression. This, in addition to the phosphorylation of SMAD2/3 and SMAD1/5, opens up the fate choice into one of either self-renewal or differentiation into BMP-induced lineages such as neural crest and epidermis. By contrast, when BMP and activin receptors are concomitantly antagonized, miR-125 isoforms are strongly activated. The consequent downregulation of SMAD4, together with the blockage of Smad phosphorylation, secures irreversible commitment toward the neural lineage. According to such molecular mechanisms, variations in the expression of miR-125 isoforms might serve as a sensor for TGF β -like molecules in the hESC environment, with a consequential role in cell fate commitment.

Acknowledgements

We thank Pauline Georges and Aurélie Poulet for technical support; Dr Christine Baldeschi for help with epidermal lineage experiments; Drs Anselme Perrier and Laetitia Aubry for input on neural induction protocols; and Dr Sandrine Baghdoyan for providing the validated CUGBP luciferase construct.

Funding

This study was supported in part by grants from Medicen Paris Region (IngeCELL); Agence National pour la Recherche; Ile de France Regional Council; and Essonne District Council.

Competing interests statement

The authors declare no competing financial interests.

Supplementary material

Supplementary material available online at <http://dev.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/dev.073627/-DC1>

References

Avery, S., Zafarana, G., Gokhale, P. J. and Andrews, P. W. (2010). The role of SMAD4 in human embryonic stem cell self-renewal and stem cell fate. *Stem Cells* **28**, 863-873.

Cao, X., Pfaff, S. L. and Gage, F. H. (2007). A functional study of miR-124 in the developing neural tube. *Genes Dev.* **21**, 531-536.

Chambers, S. M., Fasano, C. A., Papapetrou, E. P., Tomishima, M., Sadelain, M. and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat. Biotechnol.* **27**, 275-280.

Chua, J. H., Armugam, A. and Jeyaseelan, K. (2009). MicroRNAs: biogenesis, function and applications. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **11**, 189-199.

Davis, B. N., Hilyard, A. C., Nguyen, P. H., Lagna, G. and Hata, A. (2010). Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha. *Mol. Cell* **39**, 373-384.

Davis, T. H., Cuellar, T. L., Koch, S. M., Barker, A. J., Harfe, B. D., McManus, M. T. and Ullian, E. M. (2008). Conditional loss of Dicer disrupts cellular and tissue morphogenesis in the cortex and hippocampus. *J. Neurosci.* **28**, 4322-4330.

Delalay, C., Liu, L., Lee, J. A., Su, H., Shen, F., Yang, G. Y., Young, W. L., Ivey, K. N. and Gao, F. B. (2010). MicroRNA-9 coordinates proliferation and migration of human embryonic stem cell-derived neural progenitors. *Cell Stem Cell* **6**, 323-335.

Fineberg, S. K., Kosik, K. S. and Davidson, B. L. (2009). MicroRNAs potentiate neural development. *Neuron* **64**, 303-309.

Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., van Dongen, S. and Enright, A. J. (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* **36**, D154-D158.

Guenou, H., Nissan, X., Larcher, F., Feteira, J., Lemaitre, G., Saidani, M., Del Rio, M., Barrault, C. C., Bernard, F. X., Peschanski, M. et al. (2009). Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. *Lancet* **374**, 1745-1753.

Harland, R. (2000). Neural induction. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 357-362.

Kent, O. A., Chivukula, R. R., Mullendore, M., Wentzel, E. A., Feldmann, G., Lee, K. H., Liu, S., Leach, S. D., Maitra, A. and Mendell, J. T. (2010). Repression of the miR-143/145 cluster by oncogenic Ras initiates a tumor-promoting feed-forward pathway. *Genes Dev.* **24**, 2754-2759.

Kizana, E., Cingolani, E. and Marban, E. (2009). Non-cell-autonomous effects of vector-expressed regulatory RNAs in mammalian heart cells. *Gene Ther.* **16**, 1163-1168.

Lamb, T. M., Knecht, A. K., Smith, W. C., Stachel, S. E., Economides, A. N., Stahl, N., Yancopoulos, G. D. and Harland, R. M. (1993). Neural induction by the secreted polypeptide noggin. *Science* **262**, 713-718.

Lowell, S., Benchoua, A., Heavey, B. and Smith, A. G. (2006). Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells. *PLoS Biol.* **4**, e121.

Ma, Y., Jin, J., Dong, C., Cheng, E. C., Lin, H., Huang, Y. and Qiu, C. (2010). High-efficiency siRNA-based gene knockdown in human embryonic stem cells. *RNA* **16**, 2564-2569.

Makeyev, E. V., Zhang, J., Carrasco, M. A. and Maniatis, T. (2007). The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol. Cell* **27**, 435-448.

Mizuseki, K., Sakamoto, T., Watanabe, K., Muguruma, K., Ikeya, M., Nishiyama, A., Arakawa, A., Suemori, H., Nakatsuiji, N., Kawasaki, H. et al. (2003). Generation of neural crest-derived peripheral neurons and floor plate cells from mouse and primate embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 5828-5833.

Packer, A. N., Xing, Y., Harper, S. Q., Jones, L. and Davidson, B. L. (2008). The bifunctional microRNA miR-9/miR-9* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease. *J. Neurosci.* **28**, 14341-14346.

Paroo, Z., Ye, X., Chen, S. and Liu, Q. (2009). Phosphorylation of the human microRNA-generating complex mediates MAPK/Erk signaling. *Cell* **139**, 112-122.

Rybak, A., Fuchs, H., Smirnova, L., Brandt, C., Pohl, E. E., Nitsch, R. and Wulczyn, F. G. (2008). A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nat. Cell Biol.* **10**, 987-993.

Sahni, V., Mukhopadhyay, A., Tysseling, V., Hebert, A., Birch, D., McGuire, T. L., Stupp, S. I. and Kessler, J. A. (2010). BMPR1a and BMPR1b signaling exert opposing effects on gliosis after spinal cord injury. *J. Neurosci.* **30**, 1839-1855.

Schaefer, A., O'Carroll, D., Tan, C. L., Hillman, D., Sugimori, M., Llinas, R. and Greengard, P. (2007). Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs. *J. Exp. Med.* **204**, 1553-1558.

Sempere, L. F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E. and Ambros, V. (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol.* **5**, R13.

Shi, Y. and Massague, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685-700.

Smirnova, L., Grafe, A., Seiler, A., Schumacher, S., Nitsch, R. and Wulczyn, F. G. (2005). Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur. J. Neurosci.* **21**, 1469-1477.

Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J. J. and Lotvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 654-659.

Vallier, L., Mendjan, S., Brown, S., Chng, Z., Teo, A., Smithers, L. E., Trotter, M. W., Cho, C. H., Martinez, A., Rugg-Gunn, P. et al. (2009). Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression. *Development* **136**, 1339-1349.

- Viswanathan, J., Lee, S., Lee, B., Lee, J. W. and Lee, S. K.** (2007). The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Genes Dev.* **21**, 744-749.
- Viswanathan, S. R., Daley, G. Q. and Gregory, R. I.** (2008). Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science* **320**, 97-100.
- Wulczyn, F. G., Smirnova, L., Rybak, A., Brandt, C., Kwidzinski, E., Ninnemann, O., Strehle, M., Seiler, A., Schumacher, S. and Nitsch, R.** (2007). Post-transcriptional regulation of the let-7 microRNA during neural cell specification. *FASEB J.* **21**, 415-426.
- Xu, R. H., Chen, X., Li, D. S., Li, R., Addicks, G. C., Glennon, C., Zwaka, T. P. and Thomson, J. A.** (2002). BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat. Biotechnol.* **20**, 1261-1264.
- Xu, R. H., Sampsel-Barron, T. L., Gu, F., Root, S., Peck, R. M., Pan, G., Yu, J., Antosiewicz-Bourget, J., Tian, S., Stewart, R. et al.** (2008). NANOG is a direct target of TGFbeta/activin-mediated SMAD signaling in human ESCs. *Cell Stem Cell* **3**, 196-206.
- Ying, Q. L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M. and Smith, A.** (2003). Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat. Biotechnol.* **21**, 183-186.
- Yu, J. Y., Chung, K. H., Deo, M., Thompson, R. C. and Turner, D. L.** (2008). MicroRNA miR-124 regulates neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Exp. Cell Res.* **314**, 2618-2633.
- Zimmerman, L. B., De Jesus-Escobar, J. M. and Harland, R. M.** (1996). The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* **86**, 599-606.

ARTICLE 2

ORIGINAL ARTICLE

Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening

C Boissart^{1,7}, A Poulet^{1,7}, P Georges¹, H Darville¹, E Julita¹, R Delorme^{2,3}, T Bourgeron^{2,4,5}, M Peschanski⁶ and A Benchoua¹

Cortical neurons of the superficial layers (II-IV) represent a pivotal neuronal population involved in the higher cognitive functions of the human and are particularly affected by psychiatric diseases with developmental manifestations such as schizophrenia and autism. Differentiation protocols of human pluripotent stem cells (PSC) into cortical neurons have been achieved, opening the way to *in vitro* modeling of neuropsychiatric diseases. However, these protocols commonly result in the asynchronous production of neurons typical for the different layers of the cortex within an extended period of culture, thus precluding the analysis of specific subtypes of neurons in a standardized manner. Addressing this issue, we have successfully captured a stable population of self-renewing late cortical progenitors (LCPs) that synchronously and massively differentiate into glutamatergic cortical neurons of the upper layers. The short time course of differentiation into neurons of these progenitors has made them amenable to high-throughput assays. This has allowed us to analyze the capability of LCPs at differentiating into post mitotic neurons as well as extending and branching neurites in response to a collection of selected bioactive molecules. LCPs and cortical neurons of the upper layers were successfully produced from patient-derived-induced PSC, indicating that this system enables functional studies of individual-specific cortical neurons *ex vivo* for disease modeling and therapeutic purposes.

Translational Psychiatry (2013) **3**, e294; doi:10.1038/tp.2013.71; published online 20 August 2013

Keywords: cortical superficial layers; disease modeling; drug discovery; high-throughput screening; human pluripotent stem cells

INTRODUCTION

Advances on the molecular understanding of psychiatric diseases have long been challenged by the limited access to live human neurons with a genetic background associated with the disease state. For obvious reasons, biopsies of neuronal tissues in affected patients are not feasible and do not allow the full *in vitro* recapitulation of key events involved in the initiation and progression of the disease. In addition, high-throughput screening of potential therapeutic compounds (HTS), which would greatly enhance the rate of drug discovery, is compromised by the fact that live human neurons are post mitotic cells that cannot be amplified to reach the amount of biological resources needed for such of large screening campaigns. Therefore, disease-affected neurons have to be produced on demand from validated banks of human neuronal progenitors. Human pluripotent stem cells (PSC) derived from mutation-bearing blastocysts (human embryonic stem cells, hESC) or directly reprogrammed from patient somatic cells (human-induced PSC, iPSC) open a new area of disease modeling as they can virtually be differentiated into any cell type, at a scale compatible with high-throughput cell-based studies, including neuronal progenitors and post mitotic neurons.^{1,2} However, it is critical to fully control the differentiation of these PSC into neuronal types relevant to psychiatric conditions in a robust, homogeneous and timely manner.

Cortical neurons are among the primary targets of psychiatric conditions of developmental origin such as autism spectrum disorder (ASD) and schizophrenia. Common neuronal phenotypes include altered neuronal differentiation and migration, potentially leading to cortical layers disorganization, reduced soma size, abnormal neurite arborization and impaired synaptogenesis.³ As a rule, these pathological phenotypes affect glutamatergic neurons of the superficial cortical layers (II-IV), a subtype of neurons predominantly involved in interconnectivity between cortical regions within a hemisphere.⁴⁻⁷ Cortical neurons of superficial layers are thought to underlie the enhanced cognitive abilities of humans⁸⁻¹⁰ and therefore represent an attractive neuronal subtype regarding modeling of psychiatric disorders and meaningful cellular targets for high-throughput drug screening. Differentiation of PSC toward cortical excitatory neurons has been successfully achieved in mouse and human cells by forming three-dimensional epithelial structures, named rosettes, containing early neuroepithelial cells (NEP) that progressively produce the neuronal types typical for the different cortical layers in a time-dependent manner.^{11,12} These studies have clearly demonstrated that, in contrast to mouse PSC, human PSC can form superficial layer neurons, respecting the key milestones of human cortical development. Specific neuronal subtypes are produced in a predictable temporal manner with the sequential generation of preplate neurons, deep layers neurons (V-VI) and, finally, more

¹Neuroplasticity and Therapeutics, CECS, I-STEM, AFM, Evry Cedex, France; ²Human Genetics and Cognitive Functions, Institut Pasteur, Paris, France; ³Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Robert Debré Hospital, Department of Child and Adolescent Psychiatry, Paris, France; ⁴CNRS URA 2182 'Genes, synapses and cognition', Institut Pasteur, Paris, France; ⁵University Denis Diderot Paris 7, Paris, France and ⁶INSERM/UEVE UMR 861 I-STEM AFM, Evry Cedex, France. Correspondence: Dr A Benchoua, Neuroplasticity and Therapeutics, CECS, I-STEM, AFM, 5 rue Henri Desbrières, Genopole campus 1, Evry Cedex 91030, France.
E-mail: abenchoua@istem.fr

⁷These authors contributed equally to this work.

Received 17 April 2013; revised 19 July 2013; accepted 19 July 2013

superficial layers (II–IV).^{12,13} However, the transposition of these protocols to high-throughput technologies, including drug screening, face limitations. The first one is the protracted time course of these protocols. Several weeks of differentiation are necessary to obtain late-born neurons because these protocols do not involve the capture of any stable, self-renewing population of neuronal precursors but rather a slowly evolving equilibrium between progenitors and neurons progressively generated through asymmetric divisions. Consequently, these protocols have led to a mixture of the different cortical layers sequentially generated and did not allow the homogenous production of specific neuron subtypes. Second, the involvement of compact three-dimensional multilayered structures, although representative of the complex cortical organization, excludes the possibility to use a systematic and automated image-based quantification of the different aspects of neurogenesis, an approach necessary to objectively compare disease-affected and control cells then to monitor appropriately the effects of potential therapeutic compounds.

Genetic manipulations in mice have shown that cortical development can be influenced to promote the production of superficial layers.^{14,15} Here we report that this strategy of preventing spontaneous neuronal differentiation cells while promoting neurogenic competence can be applied to human PSC-derived early NEP cells. This allows the production of homogeneous and stable population of late cortical progenitors (LCP) that mainly differentiate into glutamatergic neurons of the cortical superficial layers upon removal of the neuronal differentiation barrier. The rapid and on demand production of mature neurons from these progenitors has permitted the development of HTS assays based on the quantification of the efficiency of neuronal differentiation and of the neurite outgrowth and arborization capacities of the resulting neurons. A collection of 130 small molecules with known biological activities affecting signaling pathways potentially involved in those mechanisms was built and used to validate the scale-up of the assay.

MATERIALS AND METHODS

Human iPSC derivation

Induced PSC were derived from two autistic patients (ASD lines) following appropriate ethical rules. The two patients were diagnosed with non-syndromic autism at Robert Debré Hospital according to Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-IV for the classification of neuropsychiatric disorders. Both patients carried a *de novo* mutation on SHANK-3 gene (ASD1: E809X, ASD2 Q1243X,¹⁶). After patient's legal representatives approval and patient consent when appropriated, 8-mm skin punch biopsies were obtained (study approval no. C07-33). Fibroblasts were derived from the donated tissue using standardized in-house protocols and expanded in standard fibroblast culture medium. For control iPSC lines (GM4603 and GM1869), fibroblast were obtained from the Coriell Biorepository (Coriell Institute for Medical Research, Camden, NJ, USA). Reprogramming was performed using the four human genes *OCT4*, *SOX2*, *c-Myc* and *KLF4* cloned in Sendai viruses (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and iPSC lines characterized according to.¹⁷

PSC culture

Next to the four iPSC lines, one hESC line (SA001, 46 XY, Cellartis, Goteborg, Sweden) was used in this study. All human PSC were maintained on a layer of mitotically inactivated murine embryonic STO fibroblasts in Dulbecco's modified Eagle's medium/F12 Glutamax supplemented with 20% knockout serum replacement, 1 mM nonessential amino acids, 1% penicillin/streptomycin, 0.55 mM 2-mercaptoethanol and 5 ng ml⁻¹ recombinant human fibroblast growth factor-2 (all from Invitrogen). Cultures were fed daily and passaged every 5–7 days. Manual dissection rather than enzymatic methods were routinely used to passage the cells.

PSC commitment to the dorsal telencephalic lineage

Commitment of PSC to the neural lineage was performed as described in.¹⁸ PSC were manually detached from the feeder layer, collected in N2B27

supplemented with human recombinant Noggin (500 ng ml⁻¹, Peprotech, London, UK), SB431542 (20 μM, Tocris Biosciences, Ellisville, MO, USA) and fibroblast growth factor-2 (4 ng ml⁻¹, Peprotech). They were subsequently transferred to a low-attachment Petridish and incubated for at least 4 h in order to fully remove them from the influence of the feeders. Cells were then seeded on poly-ornithine and laminin-coated (Sigma, St Louis, MO, USA Petridishes. The Rock inhibitor Y27632 (Calbiochem, San Diego, CA, USA) was used at 10 μM at the time of plating to optimize cell survival and seeding. The differentiation medium was changed after 24 h, then every other day until day 10.

LCP derivation, amplification and banking

At day 10, neural rosettes containing NEP cells were manually collected under a binocular microscope under sterile conditions. They were plated *en bloc* in poly-ornithine/laminin-treated culture dishes in N2B27 medium containing epidermal growth factor (10 ng ml⁻¹), fibroblast growth factor-2 (10 ng ml⁻¹) and brain-derived growth factor (20 ng ml⁻¹). At confluence, the cells were passed using trypsin first as small multicellular clumps (passages 2–4) at a ratio of 1:3, then as a single-cell suspension with a density of 100 000 cells cm⁻². Mass amplification was performed until passages 8–10 and cells were frozen in a mixture containing 10% dimethyl sulfoxide and 90% fetal calf serum (Invitrogen). Cryotubes were stored in liquid nitrogen until used. The Rock inhibitor Y27632 was used at the time of thawing to enhance cell recovery.

Neuronal differentiation

Neuronal differentiation of LCP-like cells was induced by plating the cells at low density (50 000 cells cm⁻²) in poly-ornithine/laminin-treated multi-well culture plates, with or without round glass coverslips, in N2B27 without growth factors. The medium was changed every 4 days with systematic addition of 2 μg ml⁻¹ of laminin to avoid detachment and clumping of neurons.

Immunostaining

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde and incubated for 10 min in blocking buffer (phosphate-buffered saline, 1% bovine serum albumin and 0.1% Triton X-100). Primary antibodies (Supplementary Table 3) were diluted in blocking buffer and applied overnight at 4 °C. After three washes in phosphate-buffered saline, secondary antibodies conjugated to Alexa fluorophores (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) were diluted at 1:1000 in blocking buffer and applied for 2 h at room temperature. The cells were washed at least three times in phosphate-buffered saline and visualized on a Zeiss inverted fluorescence microscope (Axiovert, Carl Zeiss, LePecq, France). Image acquisition was performed using the Axiovision LE software (Carl Zeiss). For nuclear counterstaining, cells were incubated in 10 μg ml⁻¹ Hoechst 33258 (Sigma) for 10 min after immunostaining.

Flow cytometry (fluorescence-activated cell sorting)

Cells were trypsinized for 5 min and a solution of 10% fetal calf serum was added to stop the reaction. The cells were collected and washed by resuspension in N2B27 and centrifugation at 1500 g for 10 min. Cells were fixed in 200 μl of freshly prepared 2% paraformaldehyde solution for 10 min on ice, washed by centrifugation and permeabilized with a 0.1% solution of saponin. After centrifugation, cells were incubated 2 h at room temperature in a solution of 200 μl of primary antibody as described in Supplementary Table 3. Cells were washed and incubated 1 h at room temperature with Alexa 488-coupled anti-isotype antibodies. Fluorescence-activated cell sorting-based counting was performed on a MACSquant cell analyzer (Miltenyi, Paris, France). Proper gating, compensations and exclusion of auto-fluorescent cells were performed using several control conditions, which included cells only probed with primary antibodies or with isotype-related non-binding antibodies.

Quantitative reverse transcription-PCR (qPCR)

Total RNAs were isolated using the RNeasy Mini extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocol. An on-column DNase I digestion was performed to avoid genomic DNA amplification. RNA levels and quality were quantified using a Nanodrop spectrophotometer. A total of 500 ng of RNA was used for reverse transcription using the Superscript III reverse transcription kit (Invitrogen). Quantitative PCR assays were prepared by loading primer mixes (1 μM of each primer in the final reaction) in duplicate wells of 384-well plates

followed by the addition of SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) and 12.5 ng of complementary DNA. PCR reactions were run and quantified using an ABI 7900 light cycler (Applied Biosystems). The quantification of gene expression was based on the DeltaCt Method and normalized to 18S expression. Melting curve and electrophoresis analysis were performed to control PCR product specificities and exclude non-specific amplification. The list of primers is provided in Supplementary Table 4 excepting Sox5 primers that were purchased at Qiagen. In addition, extensive molecular profiling of cortical progenitors was performed using 'Neurogenesis' qPCR array (SA Biosciences, Qiagen)

Chemical collections

A list of 130 small molecules of interest was constituted from a commercially available collection of 80 inhibitors of kinases (Enzo Life Sciences, Villerbanne, France) and 50 compounds selected from the literature and previously shown to be active in models of neurogenesis¹⁹. A complete list of the molecules, as well as their reported efficient dose, is provided in (Supplementary Table 2).

Automated seeding and compound delivery in the 384-well plates assay format

LCP were dissociated and plated in N2B27 at a density of 3000 cells per well in poly-ornithine/laminin pretreated 384-well plates using the Bravo automated liquid handling platform equipped with a 384 pipette head (Agilent Technologies, Santa-Clara, CA, USA). Six hours after plating, compounds were added using the same platform. Half of the medium was removed on days 4, 7 and 11, and replaced with fresh compound containing N2B27 medium \pm 2 μ g ml⁻¹ laminin.

Automated image-based high-content screening

For high-content screening assays, the fluorescent labeling was performed as described above in an automated manner using the Bravo liquid handling system. Image acquisition and analyses were performed using the Cellomics Arrayscan automated microscope (ThermoFisher, Hudson, NH, USA). The 'Colocalization' bioapplication was used to identify and count cells positive for HuCD (differentiation assay). Hoechst staining was used to identify objects to include in the analysis. A minimum of 1000 cells were analyzed per well in at least four wells at a \times 10 magnification to reach statistical robustness. To quantify neurite outgrowth and branching points, the 'neuronal profiling' bioapplication was used to track Tuj-1-positive neurites. A minimum of 200 neurons per well were analyzed in a minimum of four wells.

Statistical analyses

To assess the quality of the assay, the z' factor value was determined. This factor represents a dimensionless parameter, whose value can range between <0 and 1. It is defined as $z' = 1 - ((3\sigma^+ - 3\sigma^-) / (\mu^+ \pm \mu^-))$, where σ and μ , are the s.d.'s and the means, respectively, of the positive (+) and negative (-) controls.²⁰

The raw data of the screening were subjected to analysis of variance following by a Dunnett's test to evaluate statistical differences between cells treated with tested compounds and dimethyl sulfoxide-treated controls.

RESULTS

Differentiation of hESC into cortical NEP cells

The first crucial step in the formation of specific cortical neuronal subtypes consists in efficiently inducing the differentiation of PSC into early NEP cells of the dorsal telencephalon (NEP). We induced early NEP differentiation in a monolayer system using the two SMAD inhibitors SB431542 and Noggin²¹ in combination with the defined medium N2B27.¹⁸ We have previously reported that the efficient neural commitment of hESC can be obtained using these conditions, avoiding the use of batch-dependent component like the knockout serum replacement and suppressing the need of using a medium preconditioned by feeder fibroblasts, thus removing a source of factors that may be instrumental in patterning the nervous system. After 10 days, more than 80% of

the cells organized in 'rosettes' expressed the protein SOX1, which is characteristically associated to early NEP (Figure 1a). They were identified as dorsal telencephalic cells by their immunopositivity for both the dorsal marker PAX6 (Figure 1b) and the canonical telencephalic marker BF1 (Figure 1c). Even more precisely, they were engaged in neocortical differentiation as shown by high levels of expression of EMX2 and OTX1 (Figure 1a), whereas they hardly expressed any of either the ventral forebrain markers DLX2 and GSH2 or the more caudal markers EN-1, PAX2, PAX5 and HOXB9. The cells organized as a polarized epithelium with a luminal side expressing the apical protein ZO-1 (Figures 1d and e). Belonging to the radial glia lineage was indicated by nestin immunoreactivity (Figure 1e). Consistent with previous descriptions, however, these progenitors only produced about 40% of differentiated HuC/D immunopositive neurons upon replating for 3 weeks after mitogens withdrawal (42.33 ± 9.71 ; Figure 2a). They primarily expressed Ctip2, a molecular marker of the deeper layers of the cortex (Figure 2b).

Derivation of a homogeneous self-renewing population of precursors generating glutamatergic neurons of the cortex superficial layers

We then reasoned that the late production of neurons of the superficial layers during development *in vivo* implied that cortical NEP performed a large number of divisions before producing them, and tested the hypothesis allowing them to do so *in vitro* before inducing differentiation would have a similar effect. Accordingly, rosettes were collected manually without cell dissociation and transferred into a pro-proliferative medium with N2B27, epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor and brain-derived growth factor (EFB medium). Under these conditions, rosettes dissociated spontaneously over time, as cortical progenitors lost ZO-1 immunopositivity while maintaining nestin immunoreactivity (Figures 1f and g). After a second passage using trypsin, a population of morphologically homogenous cells growing as a monolayer was obtained and further amplified (Figure 1h). After eight passages in the EFB medium, the cells maintained the expression of the cortical radial glia markers nestin (Figure 1i), Pax6 (Figure 1j), Blbp (Figure 1k) and Sox2 (Figure 1l). In contrast, they did not express Tbr2, which is classically associated with intermediate cortical progenitors (Figure 1m). Treatment with the EFB medium successfully blocked spontaneous neuronal differentiation and promoted active cell cycling (Figures 1n and o). Molecular profiling of EFB amplified progenitors cells using qPCR arrays showed that they expressed high levels of polarized neural stem cells and radial glia markers, including Pax6, POU3F3 (Brn2), NRCAM and PARD3, in addition to genes involved in corticogenesis-like MEF2C, brain-derived growth factor, RTN4 (NOGO), ODZ1 (a target of EMX2), Filamin A and LIS1 (Figure 1p). These results were confirmed by additional qPCR analysis (Supplementary Figure 1). The same profile was maintained for at least 20 passages without either morphological changes or genomic instability (Supplementary Figure 2) and conserved upon freezing (Supplementary Figure 3). We named those cells 'LCP'.

LCPs were plated at low density, and mitogens removed in order to induce neuronal differentiation, and they quickly stopped cycling. Time course quantification of cells expressing the two neuronal markers Tuj-1 and HuC/D revealed an efficient differentiation along the neuronal lineage (Figures 2b, c and m). In parallel, quantitative reverse transcription analysis indicated the progressive appearance, over a period of 3 weeks, of Tau, MAP-2 and SNAP-25, associated to terminally differentiated neurons (Supplementary Figure 4) as well as the glutamatergic markers vGlut-1 and vGlut2 (Supplementary Figure 4). After 21 days of differentiation, more than 80% of the neurons were

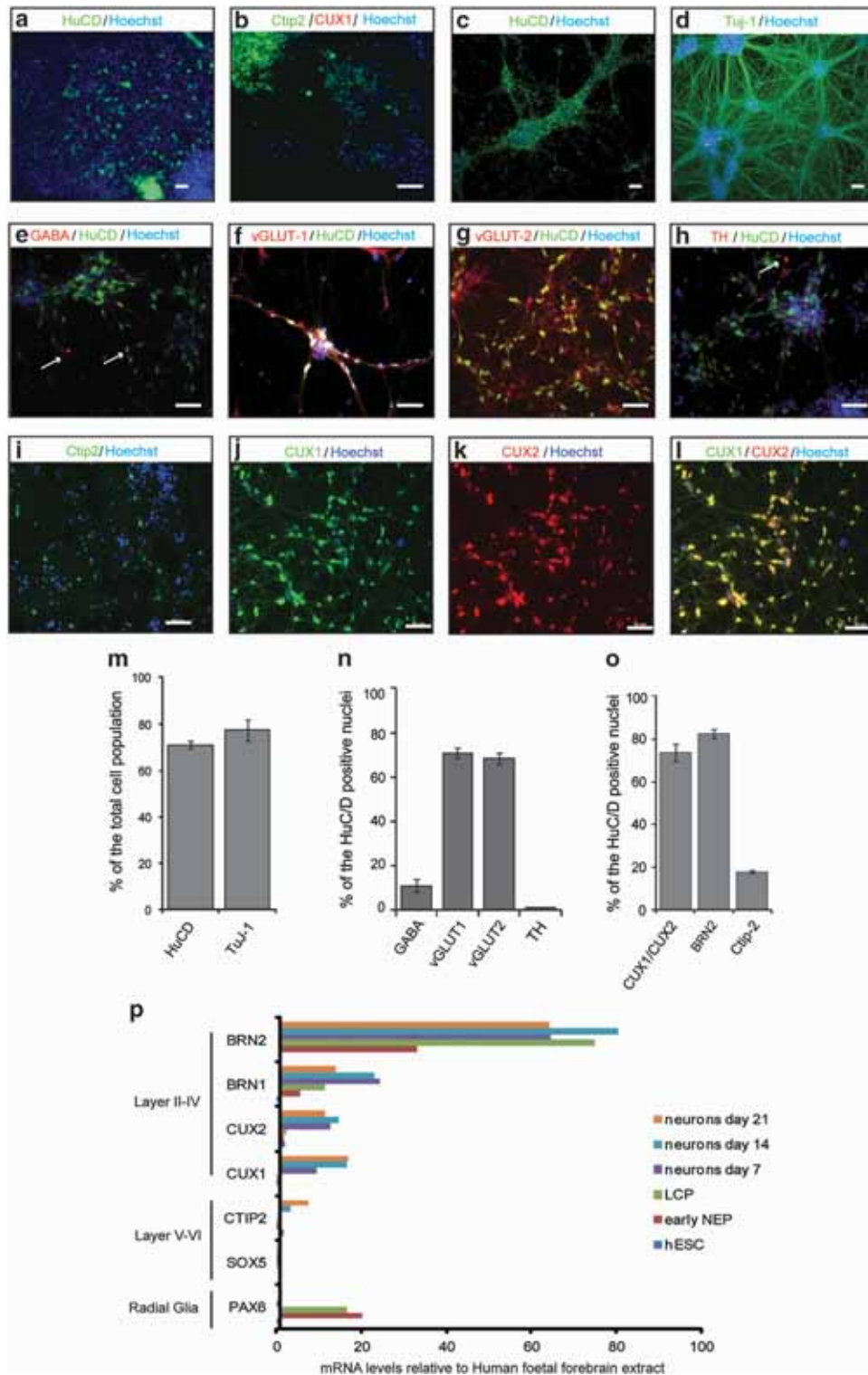


Figure 2. Production of superficial-layer neurons from late cortical progenitors (LCPs). (a, b) Cortical neurons produced by NEP differentiation 21 days after mitogen withdrawal. (c) HuC/D and (d) Tuj-1 immunopositive neurons produced by LCPs 21 days after mitogen withdrawal. (e–i) Immunocytochemical characterization of neurons produced by LCPs. (m) Automated quantification of the proportion of HuC/D and Tuj-1-positive neurons produced by LCPs after 21 days of differentiation. (n) Automated quantification of HuC/D-positive neurons expressing markers of a neuronal subtype or (o) of a cortical molecular layer. (p) Molecular profiling by RT-qPCR of hESC-derived early neuroepithelial cells (NEP), LCPs and differentiated neurons at different time points of differentiation. Results are expressed as mean \pm s.d. of three independent experiments. Scale bar = 50 μ m. TH, tyrosine hydroxylase.

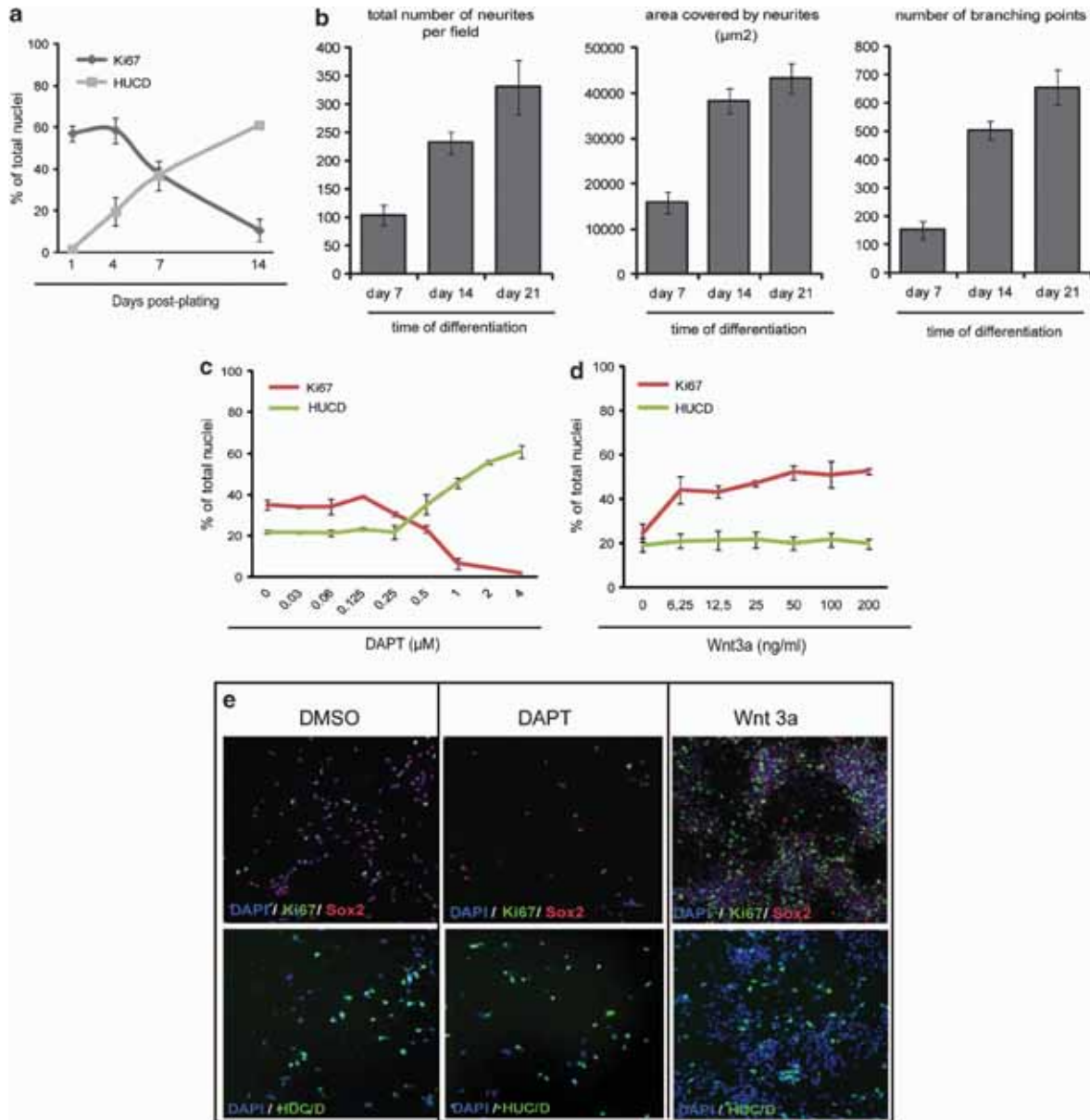


Figure 3. Amenability of late cortical progenitors (LCP) terminal differentiation into a high-throughput screening format. **(a)** Automated quantification showing the kinetics of neural proliferation (Ki-67) and neuronal differentiation (HuC/D) of LCPs in 384-well plates. **(b)** Automated quantification of the kinetic of neuritic outgrowth (Tuj-1-positive neurites). Results represent mean \pm s.d. of each parameter per field of 109 000 μm^2 in at least 16 independent wells (representative of one of three independent experiments). **(c, d)** Response of LCPs to increasing doses of DAPT **(c)** or Wnt3a **(d)**. Results are expressed as mean \pm s.d. **(e)** Representative photographs captured by the Arrayscan microscope.

immunopositive for vGlut-1 and v-Glut-2, whereas 10% expressed gamma-aminobutyric acid and less than 2% the catecholaminergic enzymatic marker tyrosine hydroxylase (Figures 2e–h and n). Neurons formed complex and branched neuritic networks as well as PSD-95 immunopositive glutamatergic synapses (Supplementary Figure 4). Over 70% of them expressed Cux1, Cux2 and Brn2, which are specifically expressed in upper layers II–IV²² (Figures 2j–l and o); thus validating our working hypothesis that an extended period of proliferation of cortical progenitors would strongly bias differentiation toward late-appearing neurons of the superficial cortical layers. The remaining neurons expressed CTIP-2, a marker of lower-layer cortical neurons (Figures 2i–o). This was confirmed by analyzing additional layer markers by qPCR (Figure 2p).

Responses of LCPs to a collection of 130 compounds in a HTS plate format

The amenability of LCP-differentiated neurons to drug screening was then analyzed. LCPs were successfully adapted to a miniaturized culture format in 384-well plates and differentiated into post mitotic neurons with a time course similar to that observed in larger culture dishes. Over 60% of HuC/D immunopositive neurons were detected after 14 days of differentiation, whereas less than 15% of Sox2 cycling cells were still present (Figure 3a). Neurons progressively formed a complex neuritic network starting at day 14 (Figure 3b). Control molecules with known opposing impact on neural differentiation were first assayed, with Wnt3a as a pro-proliferative agent²³ and Notch signaling inhibition by the gamma-secretase inhibitor DAPT as a pro-differentiating agent,²⁰

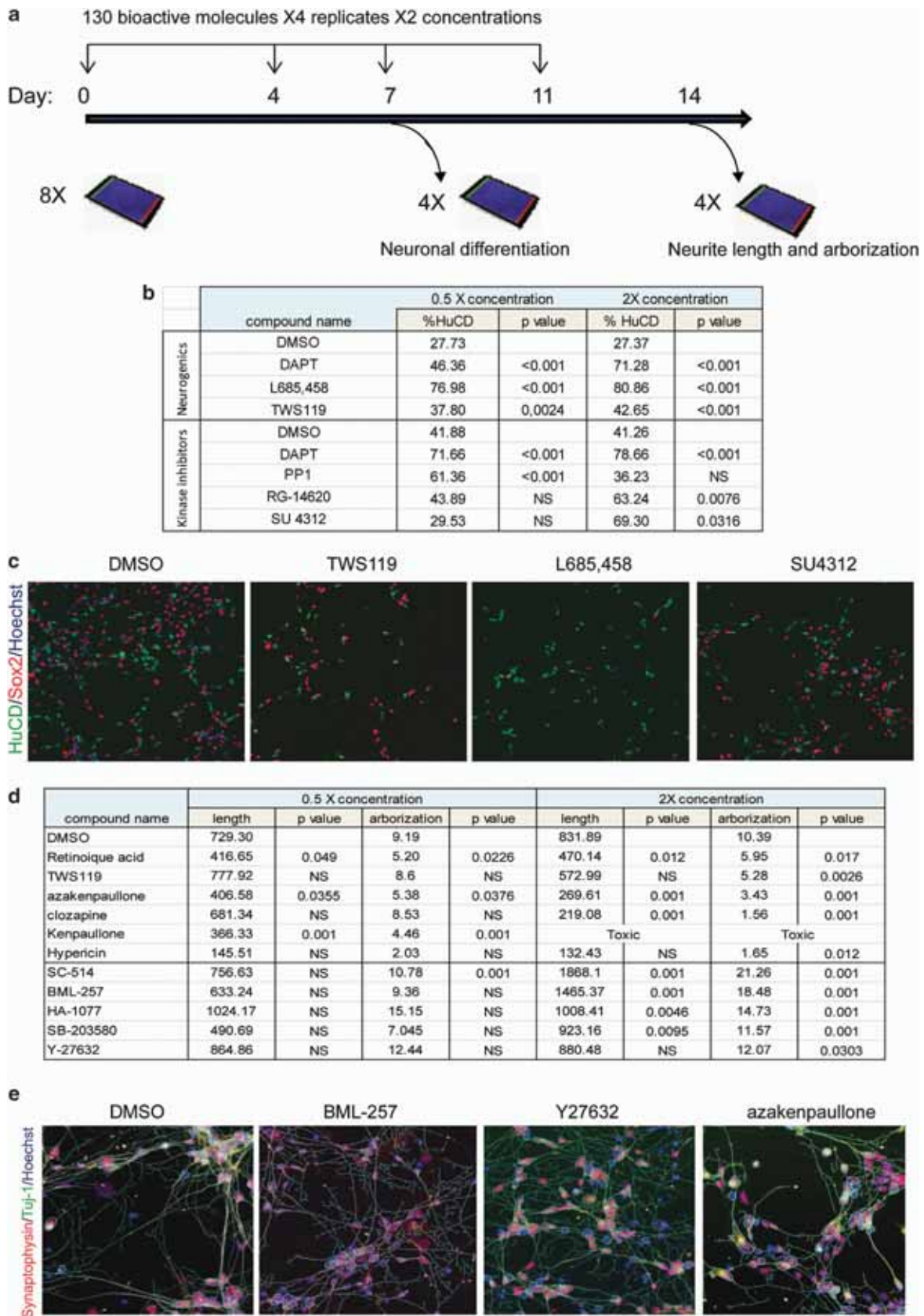


Figure 4. High-content screening of a library of 130 bioactive chemical compounds. **(a)** Screening flowchart. **(b)** List of compounds that increased the proportion of HuCD-positive neurons in the culture by more than 15%. **(c)** Representative results captured by the Arrayscan microscope. **(d)** List of compounds that modified significantly neurite length and/or arborization. **(e)** Representative results captured by the Arrayscan microscope, including the tracking of neurites. *P*-values were calculated using the Dunnett's test after an analysis of variance, NS; non significant.

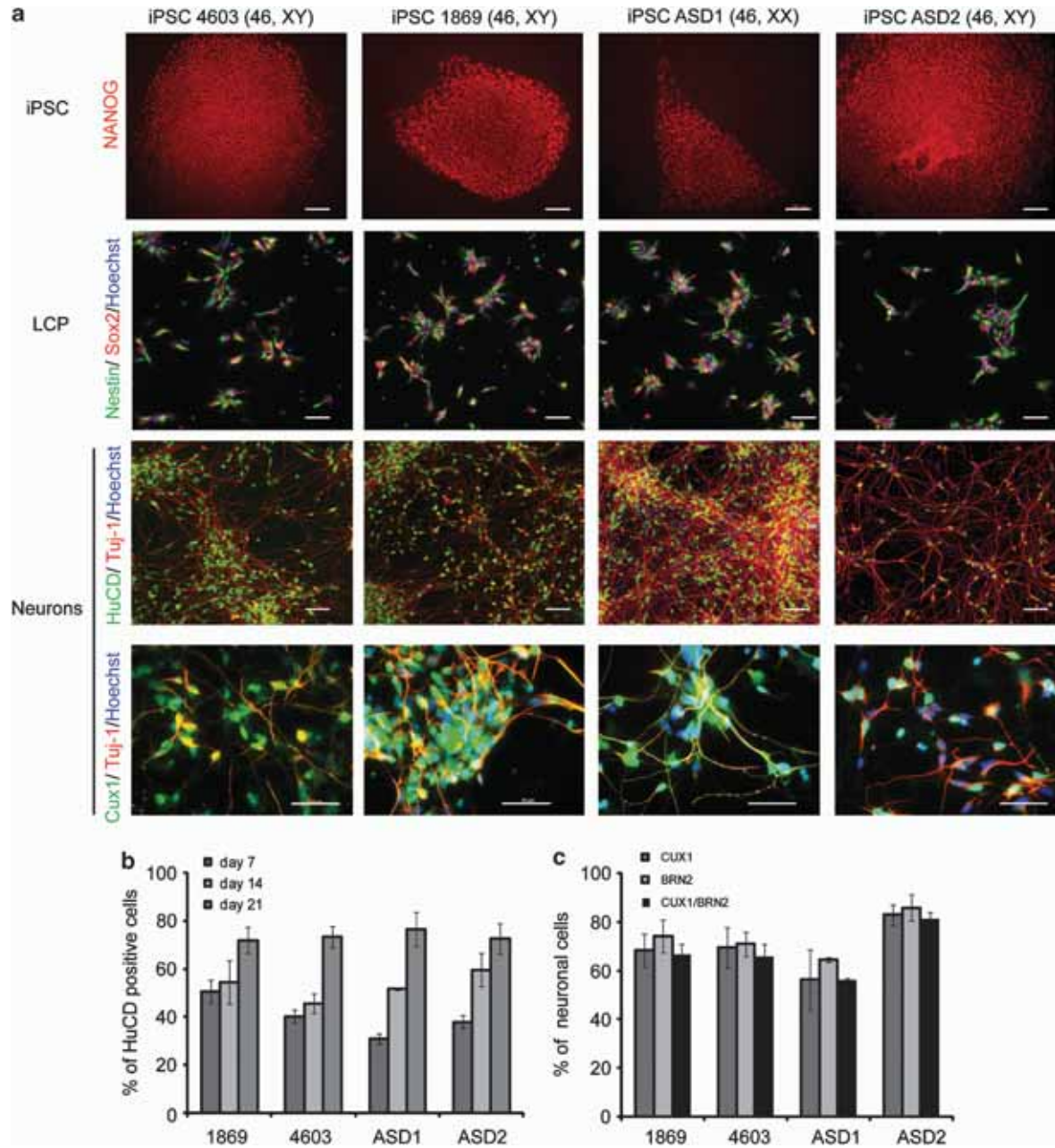


Figure 5. Differentiation of induced pluripotent stem cells (iPSC) into neurons of the superficial layers. **(a)** Representative immunocytochemistry of late cortical progenitors (LCP) and cortical neurons produced from four different iPSC lines. 4603 and 1869 iPSC lines were derived from control donors and autism spectrum disorder 1 (ASD1) and ASD2 from autistic children with SHANK-3 mutations. Scale bar = 50 μ m **(b)** Kinetic of differentiation of iPSC-derived cortical neurons. **(c)** Percentage of upper layers neurons produced after 17 days of differentiation of iPSC-derived LCP. For **(b, c)** results are expressed as mean \pm s.d. of three independent experiments.

respectively. Cells were exposed to increasing doses of either of the two molecules at the time of plating and at day 4, and the analysis was performed at day 7. As expected, Wnt-3a increased the proportion of Ki67/Sox2 immunopositive cycling LCPs while blocking the appearance of HuC/D-positive neurons, whereas DAPT strongly promoted LCPs differentiation as HuC/D immunopositive neurons (Figures 3c and d). Z' factor calculation validated the robustness of the screening assays according to (Z' factor of dimethyl sulfoxide vs controls >0.2 and Z' factor of control min vs control max >0.5 , Supplementary Figure 5,^{24,25}).

A primary screening was then performed in a search for regulators of those two functions based upon a selected chemical compounds library of 130 small molecules with known effects on

discrete signaling pathways. These included 80 kinase inhibitors and 50 additional compounds that had been reported as modifiers of neurogenesis in a variety of cellular and animal models¹⁹ (Supplementary Table 1). Changes in the production of post mitotic neurons from LCPs—revealing compounds promoting neural differentiation were analyzed after 7 days of treatment using HuC/D nuclear labeling. Modulation of neurite outgrowth and arborization was analyzed after 14 days—revealing compounds acting on neuronal maturation—using Tuj-1 cytoplasmic labeling (Figure 4a). Hit compounds were obtained in the two assays (Supplementary Table 2). Compounds stimulating differentiation of LCPs into post mitotic neurons included a gamma-secretase inhibitor different from DAPT (L695,458), a highly potent

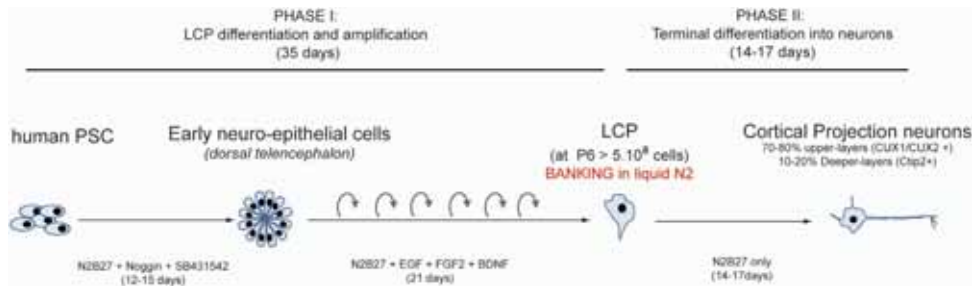


Figure 6. Overview of the timelines of the differentiation protocol. Phase I (days 0–35) corresponds to the steps of differentiation of human pluripotent stem cells (hPSC) into early cortical progenitors, the subsequent phenotypic transition to late cortical progenitors (LCP) and further amplification to create a large cell bank. After this phase, neuronal differentiation into cortical projection neurons is achieved in 14–17 days (phase II). As neuronal differentiation can be started directly from the stock of frozen LCP, the phase 1 does not need to be completed at each experiment. Liquid N₂; liquid nitrogen.

and selective inhibitor of Src family tyrosine kinases (PP1), an epidermal growth factor receptor inhibitor (RG14620), a selective inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor 2 (SU4312) and a glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) β inhibitor (TWS 119) (Figures 4b and c). Among the compounds that did not modify the rate of neuronal differentiation were five molecules that, nevertheless, promoted neuronal maturation as revealed by increased neurite length and/or arborization (number of branching points): a mitogen-activated protein kinase/p38 pathway inhibitor (SB203580), two Rock inhibitors (HA-1077 and Y27632), an IKK-2 inhibitor (SC-514) and an Akt-1 inhibitor (BML-257). Six compounds decreased the rate of neuronal maturation without altering either cell survival or differentiation: three GSK-3 inhibitors (kenpaullone, azapallone and TWS 119), two antipsychotics or mood regulators (hypericin and clozapine), and retinoic acid (Figures 4d and e).

LPCs and cortical neurons of the superficial layers can be produced from control and autistic patient-derived iPSCs

In order to evaluate whether our protocol was applicable in the context of psychiatric diseases, LCP and neurons of the cortical superficial layers were produced from iPSCs, both from controls and from two autistic patients bearing *de novo* mutations on *SHANK-3* (¹⁶). All four lines were efficiently converted into early cortical NEPs and stabilized as proliferating LCPs expressing Sox2 and nestin (Figure 5a). LCPs readily differentiated into HuCD/Tuj-1-positive neurons with the same efficiency than hESC (Figures 5a and b). The majority of neurons produced were also similarly positive for superficial layers marker in the four lines.

DISCUSSION

The goal of this study was to use human PSCs as a biological resource to robustly produce live glutamatergic neurons of the superficial layers of the cortex, a population of neurons particularly affected by psychiatric diseases, in order to study the impact of these diseases on their development and perform HTS campaigns for drug discovery. We successfully differentiated hPSCs into stable population of late cortical precursors that preferentially generated neurons of the superficial layers in a rapid and standardized manner. We showed that these cells could be used to conduct large throughput drug screening studies, identifying modifiers of human corticogenesis that may be involved in the etiology of psychiatric diseases, or conversely pointing to potential therapeutic strategies.

Superficial layer neurons represent a pivotal neuronal population particularly affected by psychiatric diseases.^{4–6,26,27} As expanded superficial layers of the cortex are among the most distinguishing features of the human brain, modeling the impact

of psychiatric diseases using these neurons may help revealing human-specific aspects. Superficial layers of the cortex are poorly developed in rodents as compared with humans, a situation replicated *in vitro* when corticogenesis is recapitulated from PSCs.^{11,12} Superficial layers neurons are late-born cells and, accordingly, their derivation from human PSCs only occurs after an extended period of differentiation. In their pioneer study, Shi *et al.*^{12,28} described a protocol recapitulating key features of corticogenesis starting from human PSC. In this three-stage process, PSC first differentiated to cortical progenitors cells resembling the cortical sub-ventricular radial glia cells that will spontaneously produce intermediate progenitors and the different types of projection neurons of the deep and superficial layers in stereotypical temporal order reminiscent of *in vivo* corticogenesis. Accordingly, superficial layer neurons appeared in small amount ($\sim 30\%$) after 80–90 days of differentiation, mixed with undifferentiated progenitors and earlier-born neurons of the deeper layers. Although very elegant, this approach, which was to our knowledge the only producing superficial layer neurons from hPSC, precluded a robust and a systematic study of the impact of a disease state on genesis and maturation of these neurons because of this protracted time of differentiation. Consequently, studies of neurons derived from neuropsychiatric patients iPSC were so far conducted using quicker protocols of differentiation leading to a mixture of GABAergic and glutamatergic neurons with not known regional identity.^{29,30} This temporal challenge is also particularly critical when addressing drug discovery using HTS as this powerful technique requires that the terminal differentiation and maturation steps of these neurons occurs in a rapid, reproducible and synchronous manner. The approach described here allowed us to differentiate and stabilize cortical precursors that could be largely amplified and preferentially produced glutamatergic neurons of the superficial layers. This was achieved by mimicking the chronobiology of the human corticogenesis, that is, by preventing the spontaneous neuronal differentiation of early NEPs patterned to adopt a dorsal telencephalic fate while promoting active cell divisions. Accordingly, the neurogenic potential of the PSC-derived cortical precursors changed from deep to superficial layers after the period of active division. Consequently, large amounts ($> 70\%$) of superficial layers neurons can be produced in less than 50 days starting from PSC (instead of 80–90 days). Importantly, as the self-renewing LCP can be cultivated and amplified as single-cell culture, they can be stored frozen as very large banks. Terminal differentiation can therefore be restarted directly from the LCP at any time, and superficial layer neurons were produced in less than 17 days (Figure 6).

The results obtained by large throughput drug screening in the present study validated the biological pertinence of our model by highlighting signaling pathways that are known to be involved in

psychiatric diseases, namely the RhoA kinase and the GSK-3-dependant pathways. Inhibitors of the Rho kinase increased neurite outgrowth and arborization in our model. The role of Rho proteins in controlling neurite growth and morphology has been largely documented, in particular for RhoA. Activation of RhoA-dependant signaling cascades indeed inhibits neurite outgrowth in response to various stimuli,^{31,32} whereas neurite outgrowth induced by neurotrophin is dependent on Rho A inhibition.³³ Mutations in several genes involved in RhoA-dependant signaling pathways have been linked to genetic forms of mental retardation, autism and schizophrenia.^{20,34–37} Conversely, three GSK-3 inhibitors strongly blocked neurite growth and arborization while impairing neither cell survival nor neuronal differentiation. Impaired GSK-3-dependant pathways have been reported in several mood disorders and are the targets of many anti-psychotic agents,³⁸ including clozapine which also showed a blocking effect on neurite growth in our screening assay. Inhibition of GSK-3 represents a promising therapeutic option for Fragile X-syndrome as phenotypic improvements have been observed in mouse models of the disease after treatment with GSK-3 inhibitors, including a normalization of the pathological increase in neurite arborization and spine density.³⁹ This has been corroborated by the results of a pilot clinical study of lithium, which targets GSK-3.⁴⁰ Interestingly, thanks to our cell-based assay, we also identified pathways involved in the very early steps of neuronal differentiation, a developmental stage hardly accessible *in vivo* but particularly important in the context of psychiatric diseases of developmental origins, where impaired neuron number and abnormal cortical organization are commonly found.

To date, several PSC lines, from embryonic origin or induced from patient somatic cells, have been obtained for diseases involving cortical dysfunction. For some of these, evidence has been obtained that known cell-autonomous phenomena can be replicated *in vitro*, including the Fragile-X syndrome,^{41,42} Rett's syndrome,⁴³ Down's syndrome⁴⁴ and schizophrenia.³⁰ In this context, our results point to the possibility of specifically exploring the impact of a mutant gene deemed responsible for neuropsychiatric diseases on the differentiation and maturation of live neurons of the superficial layers of the cortex, which are one of the most relevant cell populations in such studies. High-throughput treatment of these cells with either pharmacological agents or small interfering RNA would greatly enhanced the identification of signaling pathways involved in the development of the neuronal phenotypes associated to such diseases and improve the rate of discovery of potential therapeutic molecules.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Cecile Denis and Dr Mathilde Girard for their help with the iPSC lines, Yves Maury and Marc Lechuga for training and constant support on HTS and HCS platforms, Christine Varela and Dr Nathalie Lefort for karyotyping the cells lines. We also thank the cell bank of Pitié-Salpêtrière hospitals and the Clinical Investigation Center of Robert Debré hospitals for their technical assistance. We also thank Fabienne Giuliano who helps us with ASD1 sample collection. This study has been in part funded by Hoffmann-Laroche and Servier's laboratories, region Ile de France (DIM STEM Pole), the Bettencourt-Schueller foundation, the Orange foundation, the FondaMental foundation, the Conny-Maeva foundation, the Cognacq-Jay foundation, the ANR (ANR-08-MNPS-037-01—SynGen), Neuron-ERANET (EUHF-AUTISM).

REFERENCES

1 Marchetto MC, Winner B, Gage FH. Pluripotent stem cells in neurodegenerative and neurodevelopmental diseases. *Hum Mol Genet* 2012; **19**: R71–R76.

- 2 Phillips BW, Crook JM. Pluripotent human stem cells: a novel tool in drug discovery. *BioDrugs* 2012; **24**: 99–108.
- 3 Brennand KJ, Simone A, Tran N, Gage FH. Modeling psychiatric disorders at the cellular and network levels. *Mol Psychiatry* 2012; **17**: 1239–1253.
- 4 Ferland RJ, Guerrini R. Nodular heterotopia is built upon layers. *Neurology* 2009; **73**: 742–743.
- 5 Smiley JF, Rosoklija G, Mancevski B, Mann JJ, Dwork AJ, Javitt DC. Altered volume and hemispheric asymmetry of the superficial cortical layers in the schizophrenia planum temporale. *Eu J Neurosci* 2009; **30**: 449–463.
- 6 Hutsler JJ, Zhang H. Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Res* 2010; **1309**: 83–94.
- 7 Kwon HB, Kozorovitskiy Y, Oh WJ, Peixoto RT, Akhtar N, Saulnier JL et al. Neuro-ligin-1-dependent competition regulates cortical synaptogenesis and synapse number. *Nat Neurosci* 2012; **15**: 1667–1674.
- 8 Marin-Padilla M. Ontogenesis of the pyramidal cell of the mammalian neocortex and developmental cytoarchitectonics: a unifying theory. *J Comp Neurol* 1992; **321**: 223–240.
- 9 Hill RS, Walsh CA. Molecular insights into human brain evolution. *Nature* 2005; **437**: 64–67.
- 10 Hutsler JJ, Lee DG, Porter KK. Comparative analysis of cortical layering and supragranular layer enlargement in rodent carnivore and primate species. *Brain Res* 2005; **1052**: 71–81.
- 11 Eiraku M, Watanabe K, Matsuo-Takasaki M, Kawada M, Yonemura S, Matsumura M et al. Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell* 2008; **3**: 519–532.
- 12 Shi Y, Kirwan P, Smith J, Robinson HP, Livesey FJ. Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. *Nat Neurosci* 2012; **15**: S471.
- 13 Mariani J, Simonini MV, Palejev D, Tomasin L, Coppola G, Szekeley AM et al. Modeling human cortical development in vitro using induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; **109**: 12770–12775.
- 14 Mizutani K, Saito T. Progenitors resume generating neurons after temporary inhibition of neurogenesis by Notch activation in the mammalian cerebral cortex. *Development* 2005; **132**: 1295–1304.
- 15 Rodriguez M, Choi J, Park S, Sockanathan S. Gde2 regulates cortical neuronal identity by controlling the timing of cortical progenitor differentiation. *Development* 2012; **139**: 3870–3879.
- 16 Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, Bockmann J, Chaste P, Fauchereau F et al. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet* 2007; **39**: 25–27.
- 17 Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008; **26**: 101–106.
- 18 Boissart C, Nissan X, Giraud-Triboulet K, Peschanski M, Benchoua A. miR-125 potentiates early neural specification of human embryonic stem cells. *Development* 2012; **139**: 1247–1257.
- 19 Rishon GM. Small molecules that promote neurogenesis *in vitro*. *Recent Pat CNS Drug Discov* 2008; **3**: 200–208.
- 20 Hansen DV, Lui JH, Parker PR, Kriegstein AR. Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature* 2010; **464**: 554–561.
- 21 Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M, Studer L. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol* 2009; **27**: 275–280.
- 22 Saito T, Hanai S, Takashima S, Nakagawa E, Okazaki S, Inoue T et al. Neocortical layer formation of human developing brains and lissencephalies: consideration of layer-specific marker expression. *Cereb Cortex* 2011; **21**: 588–596.
- 23 Munji RN, Choe Y, Li G, Siegenthaler JA, Pleasure SJ. Wnt signaling regulates neuronal differentiation of cortical intermediate progenitors. *J Neurosci* 2011; **31**: 1676–1687.
- 24 Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KRA. Simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen* 1999; **4**: 67–73.
- 25 Desbordes SC, Studer L. Adapting human pluripotent stem cells to high-throughput and high-content screening. *Nat Protoc* 2012; **8**: 111–130.
- 26 Rajkowska G, Selemon LD, Goldman-Rakic PS. Neuronal and glial somal size in the prefrontal cortex: a postmortem morphometric study of schizophrenia and Huntington disease. *Arch Gen Psychiatry* 1998; **55**: 215–224.
- 27 Hill JJ, Hashimoto T, Lewis DA. Molecular mechanisms contributing to dendritic spine alterations in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2006; **11**: 557–566.
- 28 Shi Y, Kirwan P, Livesey FJ. Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks. *Nat Protoc* 2012; **7**: 1836–1846.
- 29 Marchetto MC, Carromeu C, Acab A, Yu D, Yeo GW, Mu Y et al. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 2012; **143**: 527–539.

- 30 Brennand KJ, Simone A, Jou J, Gelboin-Burkhardt C, Tran N, Sangar S *et al*. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; **473**: 221–225.
- 31 Tashiro A, Minden A, Yuste R. Regulation of dendritic spine morphology by the rho family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho. *Cereb Cortex* 2000; **10**: 927–938.
- 32 Wahl S, Barth H, Ciossek T, Aktories K, Mueller BK. Ephrin-A5 induces collapse of growth cones by activating Rho and Rho kinase. *J Cell Biol* 2000; **149**: 263–270.
- 33 Lin MY, Lin YM, Kao TC, Chuang HH, Chen RH. PDZ-RhoGEF ubiquitination by Cullin3-KLHL20 controls neurotrophin-induced neurite outgrowth. *J Cell Biol* 2011; **193**: 985–994.
- 34 Astrinidis A, Cash TP, Hunter DS, Walker CL, Chernoff J, EP. Henske. Tuberlin, the tuberous sclerosis complex 2 tumor suppressor gene product, regulates Rho activation, cell adhesion and migration. *Oncogene* 2002; **21**: 8470–8476.
- 35 Ramakers GJ. Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition. *Trends Neurosci* 2002; **25**: 191–199.
- 36 Margolis RL, Ross CA. Neuronal signaling pathways: genetic insights into the pathophysiology of major mental illness. *Neuropsychopharmacology* 2010; **35**: 350–351.
- 37 Piton A, Gauthier J, Hamdan FF, Lafreniere RG, Yang Y, Henrion E *et al*. Systematic resequencing of X-chromosome synaptic genes in autism spectrum disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2011; **16**: 867–880.
- 38 Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 in the etiology and treatment of mood disorders. *Front Mol Neurosci* 2011; **4**: 16.
- 39 Mines MA, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3: a promising therapeutic target for fragile x syndrome. *Front Mol Neurosci*. 2011; **4**: 35.
- 40 Berry-Kravis E, Krause SE, Block SS, Guter S, Wu J, Leurgans S *et al*. Effect of CX516, an AMPA-modulating compound, on cognition and behavior in fragile X syndrome: a controlled trial. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 2006; **16**: 525–540.
- 41 Urbach A, Bar-Nur O, Daley GQ, Benvenisty N. Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2012; **6**: 407–411.
- 42 Bar-Nur O, Caspi I, Benvenisty N. Molecular analysis of FMR1 reactivation in fragile-X induced pluripotent stem cells and their neuronal derivatives. *J Mol Cell Biol* 2012; **4**: 180–183.
- 43 Kim KY, Hysolli E, Park IH. Neuronal maturation defect in induced pluripotent stem cells from patients with Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: 14169–14174.
- 44 Mou X, Wu Y, Cao H, Meng Q, Wang Q, Sun C *et al*. Generation of disease-specific induced pluripotent stem cells from patients with different karyotypes of Down syndrome. *Stem Cell Res Therap* 2012; **3**: 14.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Supplementary Information accompanies the paper on the Translational Psychiatry website (<http://www.nature.com/tp>)

ARTICLE 3

Brief Report: Protein Kinase-A Inhibition is Sufficient to Support Human Neural Stem Cells Self-Renewal

PAULINE GEORGES,^a CLAIRE BOISSART,^a AURÉLIE POULET,^a MARC PESCHANSKI,^{b,c}
ALEXANDRA BENCHOUA^a

Key Words. High throughput screening • High content analysis • Human neural stem cells • Self-renewal • Protein-kinase A • Pluripotent stem cells

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article
^aCECS, ^bINSERM UMR 861, and ^cUEVE UMR 861, I-STEM, AFM, 91030, Evry Cedex, France

Correspondence: Alexandra Benchoua, Ph.D., CECS/I-STEM, 5 rue Henri Desbruères, Genopole campus 1, 91030 Evry-Cedex, France. Telephone: + 33-1-69-90-85-87; Fax: + 33-1-69-90-85-21; e-mail: abenchoua@istem.fr

Received April 2, 2015; accepted for publication August 6, 2015; first published online in STEM CELLS EXPRESS Month 00, 2015.

© AlphaMed Press
1066-5099/2014/\$30.00/0

<http://dx.doi.org/10.1002/stem.2194>

ABSTRACT

Human pluripotent stem cell-derived neural stem cells offer unprecedented opportunities for producing specific type of neurons for several biomedical applications. However, to achieve it, protocols of production and amplification of human neural stem cells need to be standardized, cost effective, and safe. This means that small molecules should progressively replace the use of media containing cocktails of protein-based growth factors. Here we have conducted a phenotypical screening to identify pathways involved in the regulation of hNSC self-renewal. We analyzed 80 small molecules acting as kinase inhibitors and identified compounds of the 5-isoquinolinesulfonamide family, described as protein kinase A (PKA) and protein kinase G inhibitors, as candidates to support hNSC self-renewal. Investigating the mode of action of these compounds, we found that modulation of PKA activity was central in controlling the choice between self-renewal or terminal neuronal differentiation of hNSC. We finally demonstrated that the pharmacological inhibition of PKA using the small molecule HA1004 was sufficient to support the full derivation, propagation, and long-term maintenance of stable hNSC in absence of any other extrinsic signals. Our results indicated that tuning of PKA activity is a core mechanism regulating hNSC self-renewal and differentiation and delineate the minimal culture media requirement to maintain undifferentiated hNSC *in vitro*. STEM CELLS 2015; 00:000–000

SIGNIFICANCE STATEMENT

Pluripotent stem cells-derived neural stem cells offer unprecedented opportunities for producing human neurons for several biomedical applications. However, defining the minimal requirement to maintain neural stem cells self-renewal *in vitro*, using small molecules rather than protein based cocktails, is a pre-requisite to fully achieve the potential of these cells. Here, we have used high throughput screening to find small molecules able to replace the prototypical EGF/FGF-2 based cocktail use to support neural stem cells self-renewal. This screen identified Protein Kinase A inhibitors and allowed us to delineate the minimal culture media requirement to maintain undifferentiated hNSC *in vitro*.

INTRODUCTION

Pluripotent stem cell (hPSC)-derived neural stem cells (hNSC) appear as one of the most promising source of human neurons for various biomedical applications, including drug discovery [1, 2], disease modeling [3, 4], and cell replacement therapies [5]. Consequently, mass cell production has become a major goal in this field [6], calling for robustness and cost-effectiveness, parameters that need to be optimized using rational and systematic approaches. This pleads for a better characterization of core pathways that delineate the minimal requirements for self-renewal of hNSC [7]. It can however be difficult to adopt a

“hypothesis-driven” approach to identify relevant small molecules to replace complex protein-based cocktail. High throughput screening (HTS) technologies, which allow the systematic comparison of hundreds of small molecules in parallel, coupled automated image analysis allowing the multiparametric quantification of pertinent cellular phenotypes, can therefore accelerate this process of characterization [7]. We have previously described the differentiation from hPSCs of a stable population of self-renewing hNSC that can be maintained for long-term expansion as self-renewing progenitors using a cocktail of growth factors composed of fibroblast growth factor-2 (FGF-2), epidermal growth factor (EGF),

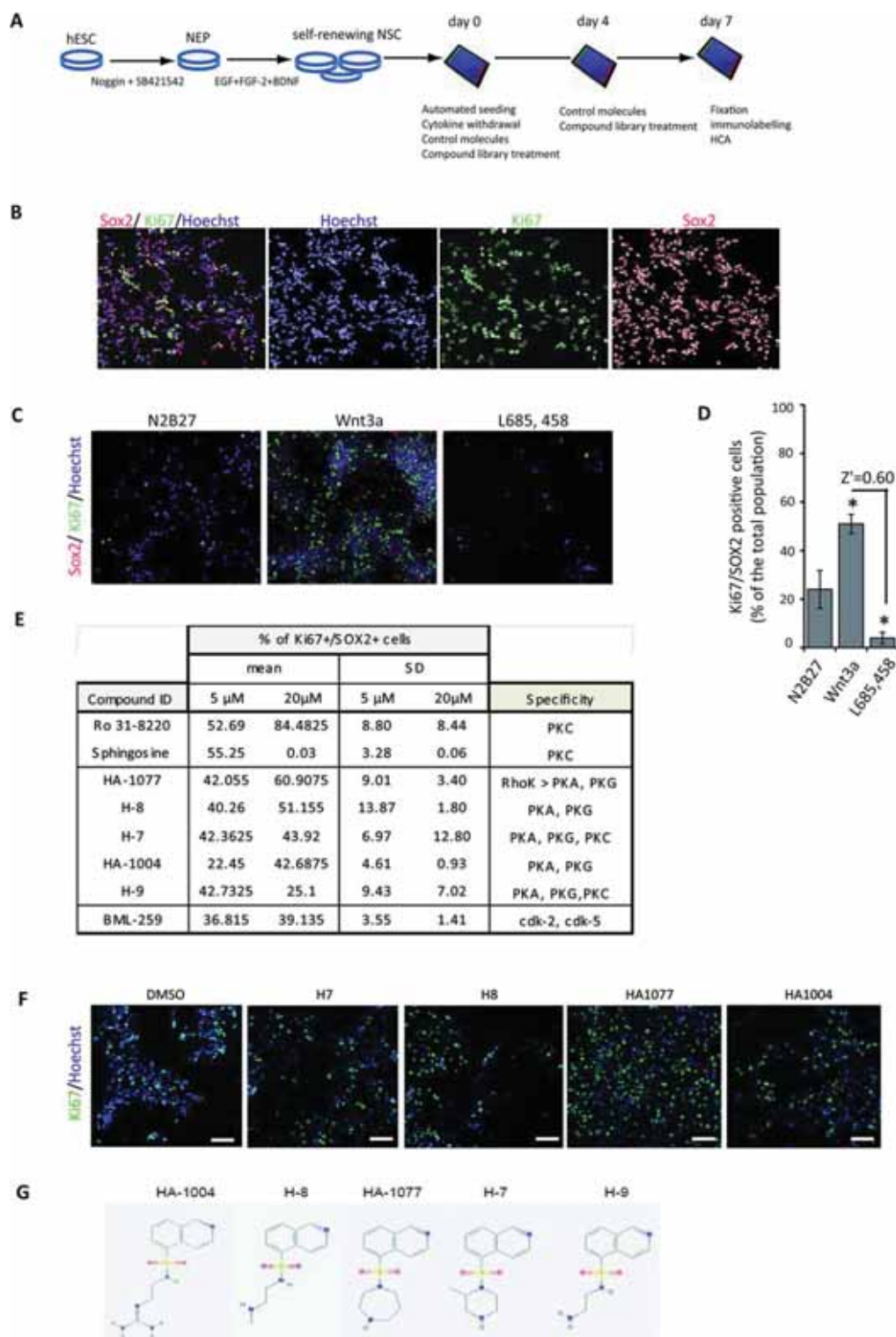


Figure 1. Identification of kinase inhibitors promoting NSC proliferation. **(A):** Schematic representation of the screening assay: Self-renewing NSC were differentiated from hESC-derived NEP using EGF/FGF-2/BDNF containing medium and banked at passage 8. NSCs were thawed and further expanded with GF-containing medium before seeding in 384-well plates and treatment with control molecules or the kinase inhibitors collection. Fixation, immunolabeling for Ki67/Sox2, and HCA were performed at day 7. **(B):** Example of image segmentation and automated cell identification. **(C):** Representative images illustrating effects of Wnt3a (positive control) and L685, 458 (negative control) upon NSC proliferation. **(D):** Quantification of Ki-67/Sox2 expressing cells after treatment of NSC with Wnt-3a and L685, 458. *, $p < .01$ ANOVA following by Dunnett's post hoc test. Z' factor was calculated as described in [9] to determine the assay dynamic range. E-Hit list of the screening and related quantification of the percentage of cells coexpressing the cell cycle marker Ki67 and the neural marker Sox2 after hit compound treatment. Results are expressed as percentage of the total cellular population expressing the given marker. Values represent means of four technical replicates. SD: Standard deviation. **(F):** Representative images illustrating the effect of 5-Isoquinolinesulfonamide family compounds. Scale bars = 100 μm . **(G):** Compound chemical structures. Abbreviations: DMSO, DimethylSulfoxide; HCA, high content analysis; hESC, human embryonic stem cell; NEP, neuroepithelial cell; NSC, neural stem cell; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; PKG, protein kinase G; EGF, epidermal growth factor; FGF-2, fibroblast growth factor-2; BDNF, brain-derived growth factor; GF, growth factors.

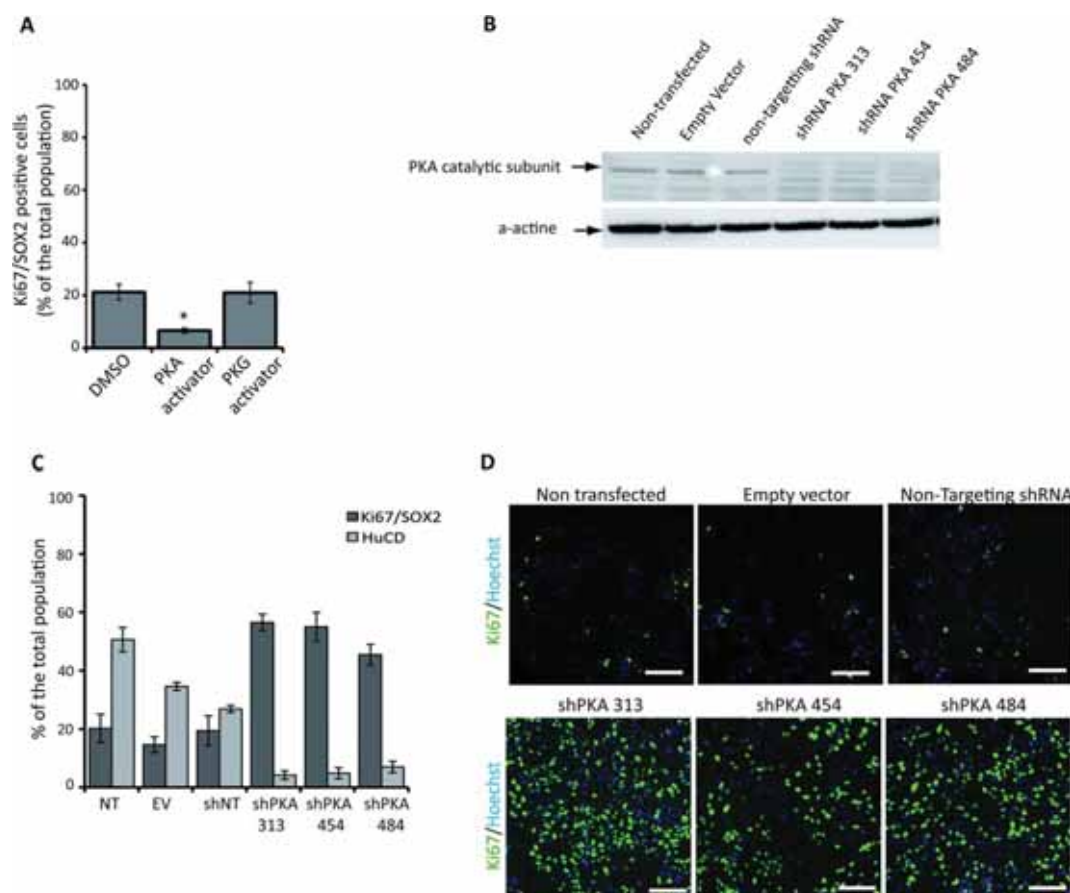


Figure 2. PKA regulates neural stem cell (NSC) balance between self-renewal and neuronal differentiation. **(A):** Modulation of NSC proliferation by PKA or PKG-activating compounds. NSC were treated with 8-chloroadenosine 3',5'-cyclic-mono-phosphate or 8-(4-chlorophenylthio) guanosine 3',5'-cyclic-mono-phosphate, as PKA or PKG activators, respectively, at day 0 and 4 after growth factor withdrawal. Quantification of percentage of cells coexpressing Sox2 and Ki67 was performed after 7 days. Values represent mean \pm SD of three independent experiments. **(B):** Validation of the shRNA-mediated downregulation of PKA catalytic subunit using Western blot. α -Actine was used as a loading control. **(C):** Comparative analysis of proliferation and neuronal differentiation properties of NSC after shRNA-mediated knockdown of PKA. Percentages of cells expressing the self-renewal marker combination Sox2/Ki67 or the neuronal marker HuC/D were quantified after 7 days of withdrawal from growth factors. Results are expressed as mean \pm SD of three independent experiments. **(D):** Representative images illustrating effects shRNA-mediated downregulation of PKA on expression of Ki67 marker. Scale bars = 100 μ m. Abbreviations: EV, empty vector; DMSO, dimethyl sulfoxide; NT, nontargeting; PKA, protein kinase A; PKG, protein kinase G; shRNA, short hairpin RNA.

and brain-derived nerve growth factor (BDNF) (so called EFB medium) and differentiate as cortical glutamatergic neurons upon growth factors withdrawal [8]. This system being amenable to HTS, we set up an assay to identify cellular pathways involved in the regulation of hNSC self-renewal screening the potential of 80 small molecules acting as kinase inhibitors.

MATERIALS AND METHODS

A detailed description of Materials and Methods is provided as Supporting Information.

RESULTS

Systematic Screening for Chemical Compounds that Promote Self-Renewal of hNSC

NSC were produced from the human embryonic stem cell (hESC) line SA001 as previously described [8] and amplified to

passage 8 in EFB medium. NSC expressed the neural markers Sox2, Nestin, and Pax6 (Supporting Information Fig. 1). Sox2 being highly expressed and restricted to the nucleus, it appeared to be the best candidate to conduct a compound screening based on automated image scanning methods. However, since Sox2 could also be expressed by undifferentiated hESC, we analyzed the expression of Oct-4 in our population of NSC. Since Sox2 was not colocalized with Oct-4 (Supporting Information Fig. 1), we considered it a good marker of NSC for a screening purpose. Systematic screening of kinase inhibitors was conducted on NSCs seeded in 384-well plates in growth factors free medium. Six hours post-seeding, cells were treated with DMSO, Wnt3a, the gamma secretase inhibitor L-685,458 or with one of the 80 tested kinase inhibitors at two different concentrations (Fig. 1A). The same treatment was repeated at day 4. The percentage of proliferative NSCs was then quantified at day 7 using an automated image analysis algorithm. Toxic compounds were excluded based on Hoechst staining. Cells coexpressing Sox2

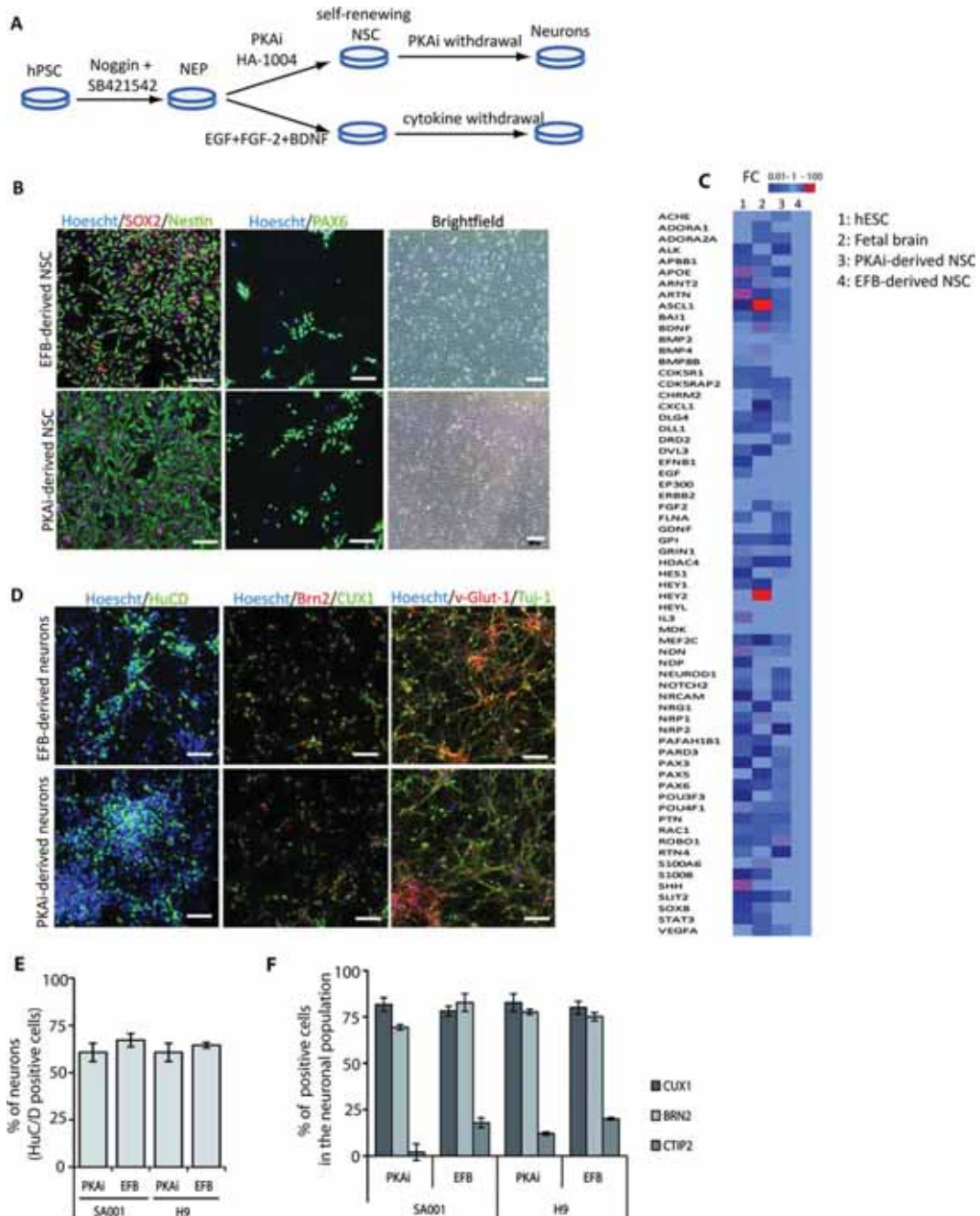


Figure 3. Growth factor free derivation, amplification, and stabilization of NSC using the PKA inhibitor HA1004. **(A):** Schematic representation of the culture protocol. NEP were differentiated from hESC using Noggin and SB431542. Half of the cells were transferred in the classical growth factors-containing medium (EGF/FGF-2/BDNF) or in HA-1004 containing medium. After eight passages, the resulting NSC were characterized. **(B):** PKAi- or EFB-derived NSC express similarly the neural markers Sox2, Nestin, and Pax6 and exhibit the same typical morphology. **(C):** Gene expression profiling of 65 genes involved in different aspects of neurogenesis by quantitative polymerase chain reaction indicated that PKAi- or EFB-derived NSC (lanes 3 and 4, respectively) have identical expression profiles that were clearly distinguishable from hESC (lane 1) or from fetal whole brain extract (lane 2). FC: Fold change of mRNA expression when compared to EFB-derived cells. **(D):** Representative images of neurons differentiated from EFB- or PKAi-derived NSC after 14 days of self-renewing factors removal. **(E):** Quantification of the percentage of cells expressing the neuronal marker HuC/D indicated that each type of NSC produce neurons with the same efficiency. This was repeated using two hESC line (SA001 and H9). **(F):** Quantification of the percentage of HuC/D positive neurons expressing the three cortical markers CTIP-2 (lower cortical layers), Brn2 and Cux1 (upper cortical layers) indicated that the two type of NSC produced the same type of neurons. **(E, F):** Results are expressed as mean \pm SD of three independent experiments. Scale bars = 100 μ m. Abbreviations: BDNF, brain-derived nerve growth factor; EGF, epidermal growth factor; EFB, EGF-FGF-BDNF containing medium; FGF, fibroblast growth factor; hESC, human embryonic stem cell; hPSC, human pluripotent stem cell; NEP, neuroepithelial cell; NSC, neural stem cell; PKA, protein kinase A.

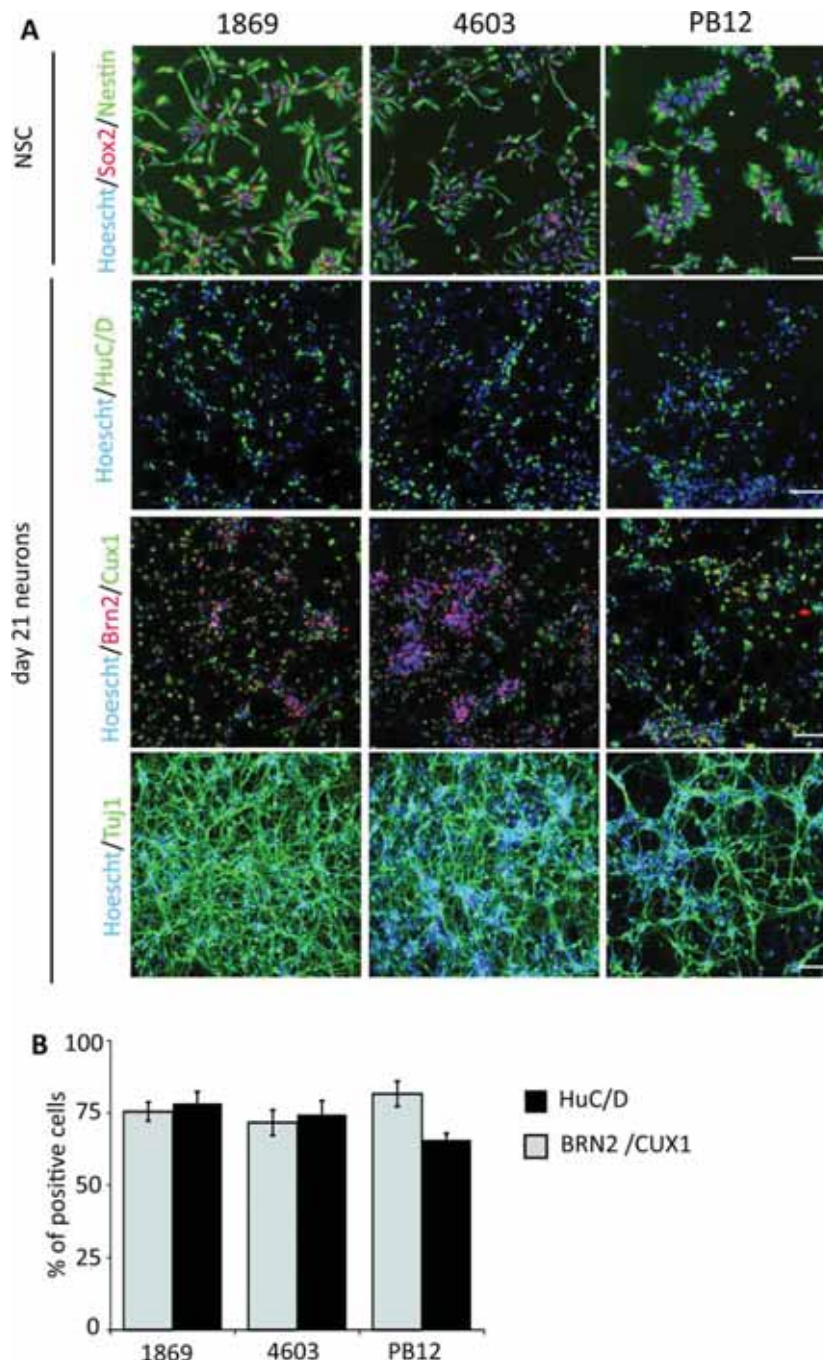


Figure 4. Derivation of NSC from iPSC using HA1004. **(A):** Expression of NSC markers (Nestin and Sox2) in NSC derived from three different iPSC lines (4603, 1869, and PB12) using the PKA inhibitor HA1004 and of several neuronal markers following their terminal differentiation. Scale bar = 100 μ m. **(B):** Quantification of neuronal differentiation efficiency (HuC/D) and subtype of neurons produced (Brn2 and Cux1) after 21 days of terminal differentiation. Results are expressed as mean \pm SD of three independent experiments. Abbreviation: NSC, neural stem cell; iPSC, induced pluripotent stem cells.

and Ki67 were considered as proliferating NSC (Fig. 1B). Twenty four percent of the cells were proliferative NSCs in DMSO-treated wells. In wells treated with Wnt-3a (positive control), the fraction of proliferative NSCs was up to 50%. Conversely, L-685,458 treatment (negative control) was characterized by reduction of Ki67/Sox2 proliferative cells down to 4%. These opposite effects validated the good dynamic range of the assay ($Z' = 0.60$, [9]) and confirmed its robustness (Fig.

1C, 1D). The results obtained with each of the 80 kinase inhibitors tested are detailed in Supporting Information Table 1. A total of eight compounds exhibited a proliferative effect according to the screening criteria, that is, an increase of at least 50% of the mean of the DMSO-treated wells (corresponding to a deviation of more than 2σ) at, at least, one of the two doses tested. Interestingly, among those eight chemical compounds, five belonged to the family of the 5-

isoquinolinesulfonamide, namely HA-1077, H-7, H-8, H-9, and HA-1004 (Fig. 1E–1G). This prompted us to investigate deeper the mode of action of this family of compounds as well as their potential to support long term expansion of NSCs.

Molecular Mechanisms Involved in the Pro-Proliferative Effects of Compounds of the 5-Isoquinolinesulfonamide Family

Compounds of the 5-isoquinolinesulfonamide family are described as targeting several kinases but to have in common a strong affinity for either protein kinase A (PKA) or protein kinase G (PKG) [10, 11]. The weight of each of these two kinases in the control of NP self-renewal was, therefore, investigated. First NSCs were withdrawn from growth factors and treated with either 8-chloroadenosine 3',5'-cyclic-mono-phosphate or 8-(4-chlorophenylthio) guanosine 3',5'-cyclic-mono-phosphate as PKA and PKG activators, respectively (Fig. 2A). This indicated that activation of PKA decreased the proportion of Ki67 expressing cells when PKG activation had no effect. In order to confirm that inactivation of PKA alone was sufficient to support NSC self-renewal, three different short hairpin RNAs shRNAs targeting the PKA catalytic subunit mRNA were stably expressed in SA001 NSCs cell line. As controls, the same NSC line was transfected in parallel with either an empty vector or a nontargeting shRNA. After verifying the correct extinction of the PKA catalytic subunit using Western blotting (Fig. 2B), the cells were seeded in N2B27 only. After 7 days, a significant increase of the percentage of Ki67/Sox2 double positive NSCs was observed for all PKA knocked-down cultures, as compared to controls (Fig. 2C, 2D). This result correlates with a reduced number of HuC/D positive cells indicating that PKA inhibition promoted progenitor cells proliferation while blocking their ability to terminally differentiate as postmitotic neurons.

Full Derivation and Amplification of hPSC-Derived NSC Using a PKA Inhibitor

The ability of PKA inhibitors to support expansion of NSCs over several passages starting directly from the neuroepithelial stage was finally assessed. HA-1004 was chosen as representative of the family because of its best specificity for PKA over other kinases [10]. Dose-response experiments determined that 40 μ M was an optimal working concentration to obtain the best proliferative effect of this compounds (Supporting Information Fig. 2). Neuroepithelial cells were produced from hESC using the dual Smad inhibition method then amplified using HA-1004 or the EFB medium (Fig. 3A). The resulting cells were analyzed after eight passages. Both type of cells exhibited the same morphology and expressed similarly the three neural markers Nestin, Sox2, and Pax-6 independently of the medium used for the amplification (Fig. 3B). They do not expressed pluripotency markers (Supporting Information Fig. 3), indicating that PKA inhibition has not contributed to support undifferentiated hESC amplification. Expression profiles of 65 genes were compared in the two types of NSC (Fig. 3C; Supporting Information Table. 2). While not perfectly identical, similar gene expression patterns were observed in the two types of NSCs. NSCs derived using HA1004 were molecularly closer of NSCs derived using EFB medium than of fetal whole brain extract, that contain a heterogeneous mixture of different neural cell types from

different brain area, or of hESC. To formally determine whether NSC derived using EFB or PKAi exhibited the same differentiation potential, they were ultimately compared in terms of quantity and quality of postmitotic neurons produced following withdrawal of the self-renewal supporting media. After 2 weeks, EFB- and PKAi-derived NPs produced similar proportions of HuC/D positive postmitotic neurons ($60.7\% \pm 4.8\%$ vs. $67.13\% \pm 3.59\%$, respectively, Fig. 3D, 3E). The two treatments also produced in a similar manner mostly glutamatergic cortical neurons (Fig. 3D, 3F). Similar results were obtained with a second hESC line (H9) (Fig. 3E, 3F) and three iPSC lines (4603, 1869, and PB12, Fig. 4) indicating that the effect reported with HA1004 was not specific of the SA001 line but reproducible between hPSC lines of different origins.

DISCUSSION AND CONCLUSION

The main result of this study is the delineation of the minimal requirement to maintain hNSC self-renewal in vitro using kinase inhibitors. Using HTS technologies aiming at identifying compounds promoting active cell division of undifferentiated hNSC, we showed that inhibition of PKA using small molecules is sufficient to support long-term maintenance of hNSC in vitro without altering their neuronal potency. Importantly, modulation of PKA activity is central in most of the signalling cascades associated with G-protein coupled receptors [12]. Several neurotrophic factors and neurotransmitters physiologically present in hNSC niches signal through these receptors [13, 14]. Modulation of PKA activity may therefore represent a core mechanism regulating the balance between hNSC self-renewal and differentiation in response to modifications of these niches. EGF/FGF-2-based cocktails are currently widely used to amplify several types of neural progenitors from different origins [15–17].

CONCLUSION

In conclusion, Our results can be of interest for any person manipulating hPSC-, fetal-, or adult-derived neural stem cells. Our work provides a rational culture system with minimal requirement from the environment to support hNSC self-renewal and should facilitate the future dissection of molecular mechanism involved in NSC biology. The systematic approach used in this study can be virtually extended to any type of tissue-specific stem cells in order to improved culture media by defined minimal self-renewal requirement.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank I-Stem's HTS platform staff for training and constant technical support; Dr. Cécile Denis for providing the 4603 and PB12 iPSC lines and Dr. Cécile Martinat for careful reading and advices about the manuscript. I-Stem is part of the Biotherapies Institute for Rare Diseases (BIRD) supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon). This study has been in part funded by Hoffmann-Laroche, by a grant from "Investissements d'Avenir"—ANR-11-INBS-0009—INGESTEM—and ANR-11-INBS-0011—NeurATRIS: A Translational Research Infrastructure for Biotherapies in Neurosciences. This study used samples from the NINDS Human Genetics Resource Center DNA and Cell Line Repository (<http://ccr.coriell.org/ninds>), as well as

clinical data. NINDS Repository sample numbers corresponding to the samples used are GM 1869 and GM 4603.

financial support; A.B.: conception and design, manuscript writing, and final approval of manuscript.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

P.G., C.B., and A.P.: collection and/or assembly of data and data analysis and interpretation; M.P.: manuscript writing and

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICT OF INTEREST

The authors indicate no potential conflicts of interest.

REFERENCES

- 1 Brock A, Goh HT, Yang B et al. Cellular reprogramming: A new technology frontier in pharmaceutical research. *Pharm Res* 2012;29:35–52.
- 2 Heilker R, Traub S, Reinhardt P et al. iPS cell derived neuronal cells for drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 2014;35:510–519.
- 3 Jung YW, Hysolli E, Kim KY et al. Human induced pluripotent stem cells and neurodegenerative disease: Prospects for novel therapies. *Curr Opin Neurol* 2012;25:125–130.
- 4 Imaizumi Y, Okano H. Modeling human neurological disorders with induced pluripotent stem cells. *J Neurochem* 2014;129:388–399.
- 5 Matsui T, Akamatsu W, Nakamura M et al. Regeneration of the damaged central nervous system through reprogramming technology: Basic concepts and potential application for cell replacement therapy. *Exp Neurol* 2014;260:12–18.
- 6 Abbasalizadeh S, Baharvand H. Technological progress and challenges towards cGMP manufacturing of human pluripotent stem cells based therapeutic products for allogeneic and autologous cell therapies. *Bio-technol Adv* 2013;31:1600–1623.
- 7 Li W, Li K, Wei W et al. Chemical approaches to stem cell biology and therapeutics. *Cell Stem Cell* 2013;13:270–283.
- 8 Boissart C, Poulet A, Georges P et al. Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening. *Transl Psychiatry* 2013;3:e294.
- 9 Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screening* 1999;4:67–73.
- 10 Lee YJ, Berns CM, Erdos G et al. Effect of isoquinolinesulfonamides on heat shock gene expression during heating at 41 degrees C in human carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;199:714–719.
- 11 Davies SP, Reddy H, Caivano M et al. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 2000;351:95–105.
- 12 Doze VA, Perez DM. G-protein-coupled receptors in adult neurogenesis. *Pharmacol Rev* 2012;64:645–675.
- 13 Banasr M, Hery M, Printemps R et al. Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology* 2004;29:450–460.
- 14 Winner B, Desplats P, Hagl C et al. Dopamine receptor activation promotes adult neurogenesis in an acute Parkinson model. *Exp Neurol* 2009;219:543–552.
- 15 Caldwell MA, He X, Wilkie N et al. Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres. *Nat Biotechnol* 2001;19:475–479.
- 16 Falk A, Koch P, Kesavan J et al. Capture of neuroepithelial-like stem cells from pluripotent stem cells provides a versatile system for in vitro production of human neurons. *PLoS One* 2012;7:e29597.
- 17 Sun Y, Pollard S, Conti L et al. Long-term tripotent differentiation capacity of human neural stem (NS) cells in adherent culture. *Mol Cell Neurosci* 2008;38:245–258.



See www.StemCells.com for supporting information available online.

ARTICLE 4



Research Paper

Human Pluripotent Stem Cell-derived Cortical Neurons for High Throughput Medication Screening in Autism: A Proof of Concept Study in SHANK3 Haploinsufficiency Syndrome



Hélène Darville^a, Aurélie Poulet^a, Frédérique Rodet-Amsellem^b, Laure Chatrousse^a, Julie Pernelle^{c,d}, Claire Boissart^a, Delphine Héron^{e,f}, Caroline Nava^{e,f}, Anselme Perrier^{c,d}, Margot Jarrige^{c,d}, Francis Cogé^g, Mark J. Millan^g, Thomas Bourgeron^{h,i,j}, Marc Peschanski^{c,d}, Richard Delorme^{b,h}, Alexandra Benchoua^{a,*}

^a CECS, I-STEM, AFM, 91030 Evry Cedex, France

^b Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Robert Debré Hospital, Department of Child and Adolescent Psychiatry, Paris, France

^c INSERM UMR 861 I-STEM AFM, 91030 Evry Cedex, France

^d UEVE UMR 861 I-STEM AFM, 91030 Evry Cedex, France

^e Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Department of Genetic and Cytogenetic, Pitié-Salpêtrière Hospital, 75013 Paris, France

^f Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06 UMR S 1127, Inserm U 1127, CNRS UMR 7225, ICM, F-75013 Paris, France

^g IDR Servier, Croissy sur Seine, France

^h Institut Pasteur, Human Genetics and Cognitive Functions Unit, Paris, France

ⁱ CNRS UMR 3571: Genes, synapses and cognition, Institut Pasteur, Paris, France

^j University Denis Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 January 2016

Received in revised form 18 May 2016

Accepted 26 May 2016

Available online 27 May 2016

Keywords:

Autism

SHANK3

High throughput screening

Valproate

Lithium

Drug repurposing

ABSTRACT

Autism spectrum disorders affect millions of individuals worldwide, but their heterogeneity complicates therapeutic intervention that is essentially symptomatic. A versatile yet relevant model to rationally screen among hundreds of therapeutic options would help improving clinical practice. Here we investigated whether neurons differentiated from pluripotent stem cells can provide such a tool using *SHANK3* haploinsufficiency as a proof of principle. A library of compounds was screened for potential to increase *SHANK3* mRNA content in neurons differentiated from control human embryonic stem cells. Using induced pluripotent stem cell technology, active compounds were then evaluated for efficacy in correcting dysfunctional networks of neurons differentiated from individuals with deleterious point mutations of *SHANK3*. Among 202 compounds tested, lithium and valproic acid showed the best efficacy at corrected *SHANK3* haploinsufficiency associated phenotypes *in cellulo*. Lithium pharmacotherapy was subsequently provided to one patient and, after one year, an encouraging decrease in autism severity was observed. This demonstrated that pluripotent stem cell-derived neurons provide a novel cellular paradigm exploitable in the search for specific disease-modifying treatments.

© 2016 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Abbreviations: ADHD, Attention Deficit Hyperactive Disorder; ADOS, Autism Diagnosis Observational Scale; ASD, autism spectrum disorders; DMSO, dimethylsulfoxide; FDA, Food and Drug Administration; GAS, Global Assessment Scale; HTS, high throughput screening; hESC, human embryonic stem cells; iPSC, induced pluripotent stem cells; NSC, neural stem cells; PPIA, Peptidylprolyl Isomerase A; PPVT, Peabody Picture Vocabulary Test; PSC, pluripotent stem cells; RPM, Raven's progressive matrices; SHANK3, SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3; SRS, Social Responsiveness Scale; VPA, valproic acid.

* Corresponding author at: CECS, I-STEM, AFM, 5 rue Henri Desbrières, Genopole campus 1, 91030 Evry Cedex, France.

E-mail address: abenchoua@istem.fr (A. Benchoua).

1. Introduction

Autism spectrum disorders (ASD) are a heterogeneous group of neurodevelopmental disorders that affect 1% of the population in developed countries and are characterized by persistent impairment in reciprocal social communication and restricted repetitive patterns of behavior (Newschaffer et al., 2007). Challenges in developing efficient pharmacotherapies for ASD reside in the limited understanding of ASD etiology, the difficulties to experimentally model the disease, the heterogeneity of symptoms and the large variety of potential triggers. Nonetheless, in around a third of patients a genetic cause has been identified (Kumar and Christian, 2009) and there appears to be a convergence on mechanisms controlling synaptic homeostasis and neuronal connectivity (Kumar and Christian, 2009; Toro et al., 2010; Bourgeron,

2015). Synapses and altered neuronal networks could be a relevant target to develop new therapeutic strategies for ASD (Spooren et al., 2012; Delorme et al., 2013). Improved understanding of the molecular substrates of autism is raising the hope of innovative “disease-modifying” treatments for altering the course of the disorder.

However, while resulting in similar pattern core of symptoms, the synaptic/connectivity alterations in individuals with ASD show a considerable degree of heterogeneity, which may mask the potential beneficial effects of a tested treatment if it is not addressed properly to a subgroup of individuals stratified on the basis of the affected genes or pathways rather than on the clinical phenotype per se (Delorme et al., 2013). This pleads for the design of new experimental and pre-clinical models to identify more personalized pharmacotherapies, approaches that require an access to relevant cellular models and tools that would allow analyzing at high throughput the effects of potential therapeutic compounds on human neurons.

In this light, we have previously shown that glutamatergic cortical neurons can be specifically differentiated from pluripotent stem cells (PSC) of either embryonic origin (human embryonic stem cells, hESC) or reprogrammed from somatic cells of patients with ASD caused by SHANK3 haplo-insufficiency (human induced pluripotent stem cells, hiPSC), and that they can serve as a cellular paradigm for high throughput screening (HTS) campaigns (Boissart et al., 2013). Permitting the systematic comparison of hundreds of small molecules in parallel, this can therefore accelerate identification of therapeutic compounds targeting pathophysiological mechanisms underlying distinct forms of ASD. The goal of the present study was to verify such a strategy by focusing on SHANK3 a key autism risk gene that codes for a synaptic scaffolding synaptic protein.

The synaptic protein SHANK3 has been linked to autism in different genetic screens where deleterious mutations affecting the SHANK3 gene were present in 0.69 to 2.12% of individuals (Durand et al., 2007; Leblond et al., 2014). SHANK3 is an abundant component of the post-synaptic density (PSD) where it acts as a scaffolding protein recruiting key post-synaptic elements, such as glutamate receptors, and linking them to the actin cytoskeleton (Boeckers et al., 2002). This scaffolding role contributes to the formation, stabilization and strengthening of the glutamatergic synapses and increases the efficiency of the glutamatergic transmission (Grabrucker et al., 2011). SHANK3 Knock-Out mice recapitulate some key autistic behaviors and show reduced number and activity of glutamatergic synapses as well as loss in experience-linked plasticity (Peca et al., 2011). At the cellular level, neurons differentiated from iPSC derived from individuals with SHANK3 haploinsufficiency, exhibit impaired electrophysiological responses to glutamatergic synapse stimulations that can be corrected by re-introducing SHANK3 cDNA expression (Shcheglovitov et al., 2013). Decreased glutamatergic neurotransmission thus appears as a central feature of SHANK3 haploinsufficiency and it can be reversed by restoring correct dosage of SHANK3 even during adulthood (Toro et al., 2010). In individuals with ASD, *de novo* loss-of-function mutations of SHANK3 reported in the literature affect only one allele of the gene, offering the opportunity to enhance transcription of the second allele, or improve mRNA stability and translation. We have therefore developed a high throughput molecular screening assay in order to pinpoint compounds increasing SHANK3 mRNA levels in human neurons derived from pluripotent stem cells.

2. Methods

2.1. Human Pluripotent Stem Cells (hPSC) Origin

One hESC and 4 iPSC lines were used in this study. The male hESC line SA001 was obtained from Cellartis (Goteborg, Sweden). The work involving hESC line was supervised by the French Bioethics Agency (Agreement number NOR AFSB 12002 43S). The control iPSC line 1869 was published previously (Boissart et al., 2013) and reprogrammed

from fibroblasts obtained from the Coriell's biorepository (Coriell Institute for Medical Research, NJ, USA). The control line PB12 was reprogrammed from PBMC obtained from an anonymous blood donor at the French Blood Donor Organization. SHANK3-iPSC lines were derived from fibroblasts of 2 children with ASD carrying independent *de novo* SHANK-3 mutations. The 2 patients were diagnosed with autism and severe intellectual deficiency at the Robert Debré and Pitié-Salpêtrière Hospitals according to DSM-IVTR criteria. Patient 1 (AUN-003, Leblond et al., 2014) carries a *de novo* truncating mutation P.Glu809X in exon 21 and corresponds to iPSC line SHANK3-STOP. Patient 2 carries a frame shift mutation (c.3853_3857dup, p. Gly1287Alafs X15) and corresponds to the iPSC line SHANK3 frame-shift. Both were included initially in a national observational study (IDRCB 2008-A00019-46). After patient's legal representatives approval, 8-mm skin punch biopsies were obtained (study approval by Committee for the Protection of Persons, CPP no. C07-33). Fibroblasts were derived from the donated tissue and reprogrammed using the four human genes OCT4, SOX2, c-Myc, and KLF4 cloned in Sendai viruses (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and iPSC lines characterized according to Nakagawa et al. (2008). The same procedure was used to reprogrammed and characterized control iPSC lines.

2.2. Derivation of Cortical Neural Stem Cells (NSC) from PSC

Commitment of PSC to the neural lineage and derivation of stable cortical NSC was described previously (Boissart et al., 2012, 2013). Briefly, neural commitment was induced using the BMP inhibitor Noggin (500 ng/ml, Peprotech, London, UK) and the Nodal inhibitor SB431542 (20 μM, Tocris Biosciences, Ellisville, Missouri, USA). At day 10, neural rosettes containing neuro-epithelial cells were collected and plated *en bloc* in poly-L-ornithin/laminin treated culture dishes in N2B27 medium containing Epidermal Growth Factor (EGF, 10 ng/ml, Peprotech, Neuilly, France), FGF-2 (10 ng/ml, Peprotech) and Brain-derived Growth Factor (BDNF, 20 ng/ml, Peprotech). At confluence, the passages were performed using trypsin at a density of 50,000 cells/cm². Mass amplification was performed until passage 8 and cells were frozen. To start the terminal differentiation as post-mitotic neurons, cortical NSC were dissociated and plated in N2B27 without growth factors.

2.3. Compound Library

Two hundred and two small molecules were investigated, belonging to two commercially available libraries (Screen-Well® Kinase Inhibitor library, Enzo-life Sciences, 76 compounds and Screen-Well® Epigenetics library, Enzo-life Sciences, 43 compounds), I-stem laboratory reference compounds (Boissart et al., 2013, 50 compounds) and FDA approved drugs or related active principle (33 compounds). The complete list of compounds is provided in Table S1.

2.4. Automated and High Throughput Quantification of SHANK3 mRNA in Human Neurons

To start cortical neuron differentiation, NSC were dissociated and plated in N2B27 at a density of 6000 cells/wells in poly-L-ornithin/laminin pre-treated 384 well plates using the Bravo™ automated liquid handling platform equipped with a 384 pipette head (Agilent Technologies Inc., Santa-Clara, CA, USA). Half of the medium was changed twice a week. In those conditions, neuronal differentiation is achieved after 11 to 14 days. Kinetic of SHANK3 mRNA expression was established to determine the best time point to perform the screening (Fig. S1) and day 14 was chosen since it offered the best dynamic range to quantify increase in SHANK3 mRNA expression. At day 14, compounds to be tested were added using the same platform in four replicates. The development and validation of the automated high throughput PCR assay by itself was performed following published standards for qPCR based HTS (Bittker, 2012). mRNAs were extracted and

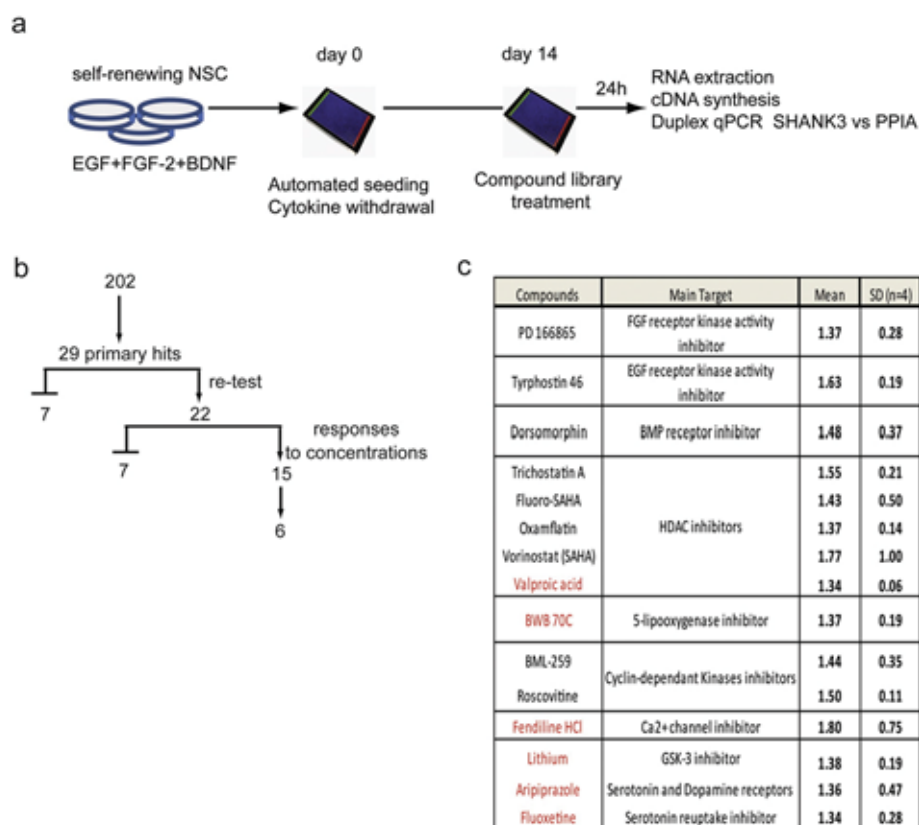


Fig. 1. SHANK3 screening results. a) Screening work flow. b) Screening success rate. Among 202 molecules, 29 primary hits (increase of at least 30% of expression of the DMSO-treated wells which correspond to a statistical deviation of more than 2σ) were identified. Independent re-testing confirmed 22 compounds. Dose response experiments revealed a concentration-dependent mode of action for 15 compounds. Among this list of 15 compounds, 6 were chosen for further investigation. c) Table summarizing the name of the 15 compounds demonstrating a dose-dependent effect on up-regulating SHANK3 mRNA, their known biological target or medical application and their performance in the primary screening. Results are presented as the mean fold-change values compared to DMSO treated cells and standard deviations (SD) of the 4 biological replicates. The 6 compounds chosen for further investigation are in red.

directly converted in cDNA in the assay plate using the FastLane technology (FastLane Cell Multiplex Kit, Qiagen, Courtaboeuf, France) with minor modifications. A duplex qPCR strategy was used, consisting in amplifying and quantifying both SHANK3 and the house keeping gene *PeptidylProlyl Isomerase A* (PPIA) in the same well (QuantiFast Probe Assay DP Kit). The robustness of this method was evaluated by performing it in 66 technical replicates. Ct values were consistent between technical replicates with minimal inter-well variations (Fig. S1). In order to evaluate the sensitivity of the duplex TaqMan PCR to SHANK3 mRNA level modifications, SHANK3 specific shRNAs were used to artificially decrease the level of transcripts in PSC-derived neurons. Sister neuronal cultures were nucleofected (Amaxa, Lonza, Amboise, France) with non-targeting shRNAs as controls. The performance of the simplex method was compared with the automated duplex Taqman qPCR strategy and both strategies found equally efficient, indicating that automation and multiplexing had not compromised the sensitivity and specificity of the assay (Fig. S1). Finally, the dynamics of SHANK3 mRNA synthesis was analyzed in order to estimate a relevant duration of treatment with the tested compounds. Neurons were treated with 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) during 48 h to block mRNA production (Fig. S1 Sehgal et al., 1976). Treatment with 100 μ M of DRB decreased SHANK3 mRNA content by 63%. After 24 h of release from DRB, SHANK3 mRNA contents were partially reconstituted and reached 80% of the non-treated cells. Neurons were, therefore, treated over 24 h for drug screening. The final screening workflow is summarized in Fig. 1a. Fold change variations induced by compound treatments were calculated using the $\Delta\Delta$ Ct method with DMSO-treated cells as controls and PPIA as the reference gene.

2.5. Automated Image-based High Content Screening

For high-content screening assays, cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min at 4 °C. Primary antibodies (Table S2) diluted in blocking buffer were applied overnight at 4 °C. Hoechst 33,258 (2 μ g/ml, Sigma) and secondary antibodies conjugated to Alexa fluorophores (Molecular Probes, Eugene, Oregon, United States) were diluted at 1:1000 in blocking buffer and applied for 2 h at room temperature. To quantify synapses, image acquisition and analyses were performed using the ImageXpress® Micro XLS system (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). A presynaptic marker and a postsynaptic marker were used and multiplexed with the neuronal markers HuC/D and beta III Tubulin (anti-Tuj-1 antibodies) to identify neurons and create a “neurite” mask. An algorithm was then generated using MetaXpress™ software application modules in order to identify pre- and post-synaptic spots specifically located on neurites, then to count the number of spot co-localization (considered as synapses). Results were expressed as the density of spots for 100 μ m of neurite. A minimum of 10 sites per well (approximately 2000 neurons) was analyzed. For neuritic network parameter analysis, image acquisition was performed using Cellomics Arrayscan system (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA). Beta-III tubulin staining was used to track neurite using “Neuronal profiling” bioapplication as described in (Boissart et al., 2013).

2.6. Spontaneous Calcium Oscillation Recording

After 35 to 42 days of differentiation, neurons were treated during 120 h with compounds of interest in 384 well-plates. Cells were

incubated for 10 min at 37 °C with the Fluo-4 probe diluted at 1 mM in a loading buffer (HBSS 1X, Hepes Buffer 20 mM, pH 7.4). After 3 washes with Mg²⁺-free Buffer (HBSS w/o CaCl₂, w/o MgCl₂, Hepes Buffer 20 mM, CaCl₂ 2 mM, pH = 7.4), neurons were recorded in the Mg²⁺-free Buffer. The fluorescence reading was performed with the ImageXpress® Micro XLS System at 37 °C. Neurons were recorded every second during 3 min with an exposure time of 350 ms. Total fluorescence curves were extrapolated using MetaXpress software.

2.7. Transcriptome Analysis

For transcriptome analysis of gene expression perturbations induced by lithium and VPA, human neurons differentiated from the SA001 line were treated during 24 h with compounds and RNA extracted using RNeasy extraction kit following manufacturer's instructions (Qiagen). Fifty ng of total RNA was reverse transcribed using the Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression kit (Revision A.0) following the protocol of the manufacturer (Thermo Fisher Scientific). The cDNA libraries were amplified and barcoded using Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression core panel and Ion Xpress Barcode Adapter (Thermo Fisher Scientific). The amplicons were quantified using Agilent High Sensitivity DNA kit before the samples were pooled in sets of eight. Emulsion PCR and Enrichment and loading was performed on the Ion Chef Instrument using the Ion PI IC 200 Kit (Thermo Fisher Scientific). Samples were loaded on an Ion PI v3 Chip and sequenced on the Ion Proton System using Ion PI IC Hi-Q 200 Kit chemistry (200 bp read length Thermo Fisher Scientific). The output files (FASTQ files) were imported into the RNA-seq pipeline of Partek Flow software (v 4.0, Partek Inc., St Louis, MO, USA) using hg19 as a reference genome. To determine genes that are differentially expressed between groups mapped reads were quantified using Partek E/M algorithm (the resulting counts represent the gene expression levels for over 20,800 different genes present in the AmpliSeq Human Gene Expression panel) and differentially expressed gene were identified using Partek Gene Specific Analysis (GSA) algorithm. Biological interpretations of the list of differentially expressed genes were performed using Partek Flow v4.0 and the pathway analysis platform EnrichR (Chen et al., 2013).

2.8. Statistical Analyses

Data were subjected to ANOVA following by a *t*-test to evaluate statistical differences between cells treated with tested compounds and DMSO-treated controls. The number of biological replicates, corresponding to independent differentiations or neuronal cultures, is indicated in figure legends.

3. Results

3.1. Screening of Compounds Regulating SHANK3 mRNA Expression in Human Neurons Differentiated from hESC

A collection of 202 compounds was chosen for the primary screening of SHANK3 regulators. This collection included a set of FDA-approved therapeutic compounds widely used for a variety of psychiatric and neurological diseases including epilepsy, bipolar disorders, major depressive disorders or schizophrenia. It also included epigenetic regulators, kinase inhibitors and compounds identified previously as modulators of neurogenesis (Boissart et al., 2013) (Table S1). Reprogramming of somatic cells into iPSC being potentially responsible for induction of epigenetic and imprinting alterations that could bias the study of gene regulation (Pick et al., 2009; Urbach et al., 2010; Lister et al., 2011), the primary drug screening was conducted using neurons differentiated from the control hESC line SA001. The 202 compounds were screened in 4 biological replicates at one concentration determined for each compound based on data from the literature or from our own

previous findings (Boissart et al., 2013; Georges et al., 2015). This primary drug screening identified 29 primary hits that increased SHANK3 mRNA content by at least 30% as compared to DMSO-treated cells and with a deviation from the DMSO mean of more than 2 σ (Fig. 1b and Table S1). Re-testing of these 29 hits in an independent experiment confirmed 22 compounds (Fig. 1b). Dose-response experiments were then conducted and revealed a concentration-dependent mode of action for 15 of them (Fig. 1b and c). Among this list of 15 compounds, 6 were chosen to be further investigated: 5 FDA-approved compounds (fendiline dihydrochloride, lithium, valproic acid, aripiprazol and fluoxetine) and the 5-lipoxygenase inhibitor BWB-70C since it regulated a pathway that can be targeted by the FDA-approved compound Zileuton. The optimal concentrations for each pharmacological compound were determined from the mRNA dose-response curves, and defined as follows: lithium 0.5 mM, valproic acid (VPA) 2 mM, aripiprazol 7.5 μ M, fluoxetine 10 μ M, fendiline 5 μ M, BWB70C 40 μ M (Fig. S2).

3.2. Modification of SHANK3 Synaptic Content and Neuronal Activity by Hit Compounds

The functional potential of the six drugs was first evaluated in neurons derived from the SA001 hESC line. SHANK3 protein levels and its recruitment to the glutamatergic synapses, as well as increased glutamatergic activity of neuronal network were used as indicators of compound efficacy. The time course of synaptogenesis was analyzed by quantifying the number of spots of the pre-synaptic protein Synapsin and of the post-synaptic density component PSD-95 present on neurites, a co-localization suggesting a glutamatergic synapse (Fig. 2a). In untreated hESC-derived neuronal cultures, expression of Synapsin and PSD-95 in the neuritic compartment progressively increased from day 14 to 28 and synapses were clearly present at day 28. The effects of the 6 compounds on SHANK3 synaptic content was therefore analyzed at that later stage. In order to optimally quantify SHANK3 protein production following treatment, cells were exposed to compounds for at least 120 h.

Only 3 out of the 6 compounds increased SHANK3 at the protein level in neurons at the tested concentrations, namely lithium, VPA, and fluoxetine (Fig. 2b). The same 3 compounds also significantly increased the number of neuritic sites in which SHANK3 co-localized with PSD-95 (Fig. 2c and d; Fig. S3), suggesting an efficient recruitment at the post-synaptic density. Treatment with lithium and VPA, but not fluoxetine, increased the co-localization of SHANK3 with the presynaptic marker Synapsin, taken as the indication of SHANK3 containing synapses (Fig. 2c and d).

The relationship between the increased number of SHANK3-containing synapses and functional changes in the neuronal network connectivity was then investigated. At day 37, neurons were treated with lithium, VPA or fluoxetine during 5 days, then network spontaneous calcium oscillations (SCO), reflecting the number of mature synapses (Dravid and Murray, 2004; Cao et al., 2015), were measured using Fluo-4 calcium probe (Fig. 3). Lithium and VPA, but not fluoxetine, increased both SCOs frequency and intensity in treated cortical neurons in a statistically significant manner indicating increased network connectivity. This effect was strongly decreased (VPA) or totally lost (lithium) in neurons in which shRNAs targeting SHANK3 were expressed, confirming that the effects of the drugs were dependent on SHANK3 (Fig. 3).

3.3. mRNA Profiling Following VPA and Lithium Treatments

In order to document more generally the effect of lithium and VPA on synaptic mRNAs, expression profile of 150 neuronal and synaptic genes was established after treatment of SA001-derived neurons by lithium or VPA (Fig. 4a and Table S3). Lithium exerted a discrete effect with only 16 genes up-regulated in the same range as SHANK3, i.e. with a fold change compared to DMSO of more than 1.4, none of them

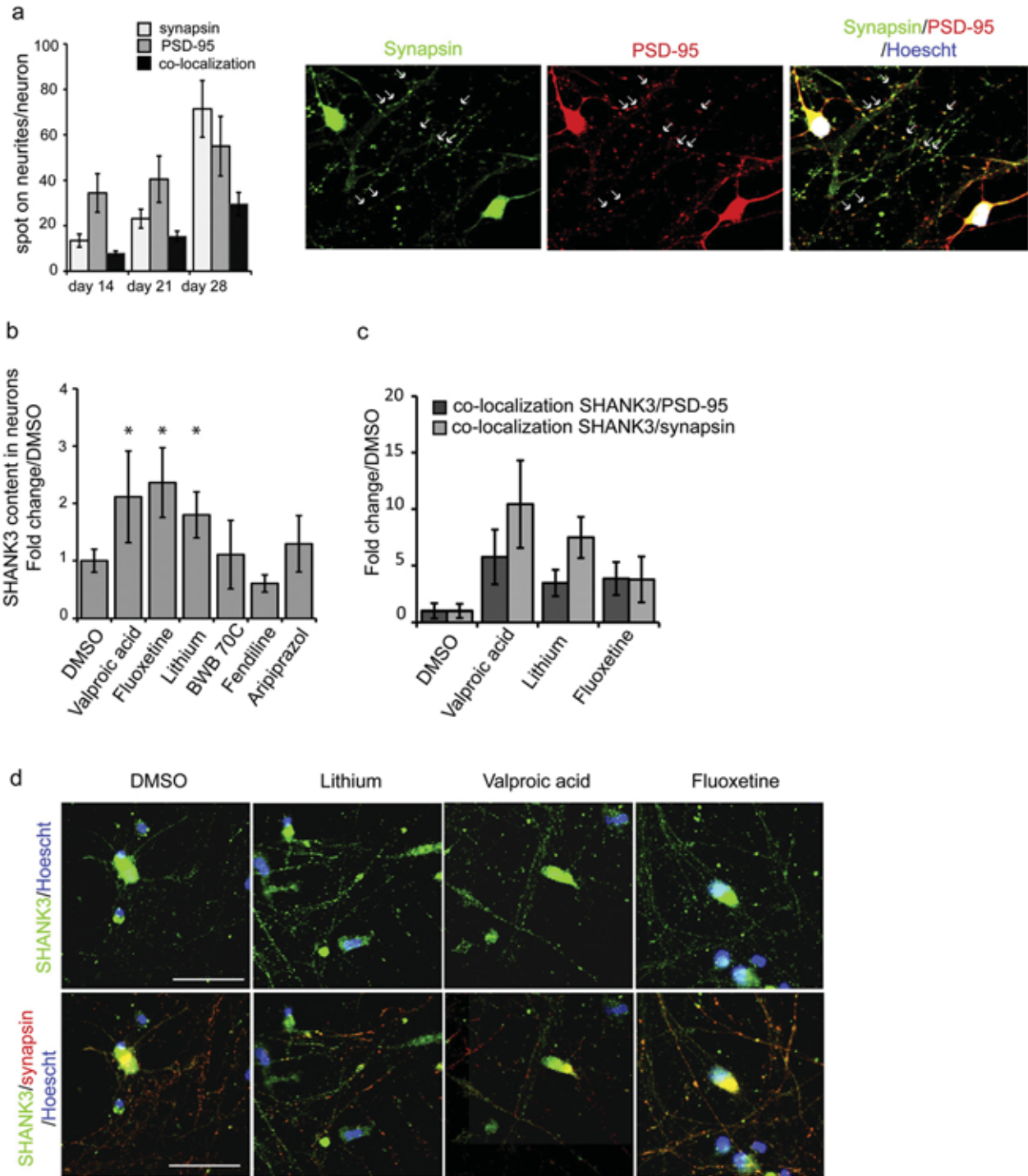


Fig. 2. Effect of hit compounds on SHANK3 protein expression and synaptic location. a) Time course analysis of synapse formation in hESC-derived developing neurons. Results are expressed as mean \pm SD of 3 independent neuronal cultures (biological replicates, left panel). Representative images of the pre-synaptic marker Synapsin (green) and the post-synaptic marker PSD-95 (red) are shown on the right panels. Arrow indicates example of co-localization of PSD-95 and Synapsin signaling structural synapses. b) Quantification of SHANK3 protein expression on dendrites after treatment with hit compounds. Results are expressed as mean \pm SD of 6–8 independent neuronal culture/ treatment (biological replicates) and as fold change compared to DMSO-treated cells. * $p < 0.01$ t-test c) Quantification of SHANK3 protein co-localization with synapsin and PSD-95 after compound treatment. Results are expressed as fold change of DMSO treated cells (mean \pm SD, 6–8 biological replicates par treatment). d) Representative image of SHANK3 (green) co-localization with synapsin (red). Scale bar = 50 μ m.

being up-regulated more than 3 fold. Among these 16 genes, 6 were direct or indirect partners of SHANK3 at the synapse, namely, the PSD protein HOMER2, the metabotropic glutamate receptors GRM1, GRM3 and GRM6, the NMDA receptor sub-unit NR4A1 and the metalloprotease MMP-9. The 10 additional genes were neurotrophins (*NTF3* and *NTF4*), GABA transporters (*SLC6A12* and *SLC6A13*), one purinergic receptor

(*P2RX7*), interleukin *IL1B*, arginine vasopressin *AVP*, NO synthase *NOS-1* and two protein kinases (*PRKG1* and *PRKCG*). In contrast, VPA profoundly modified synaptic mRNAs content with more than 60% of the genes being up-regulated above 1.5 fold as compared to DMSO, and up to 34 fold changes. This discrete effect of lithium on gene expression was further confirmed by global transcriptomic analysis. Whole

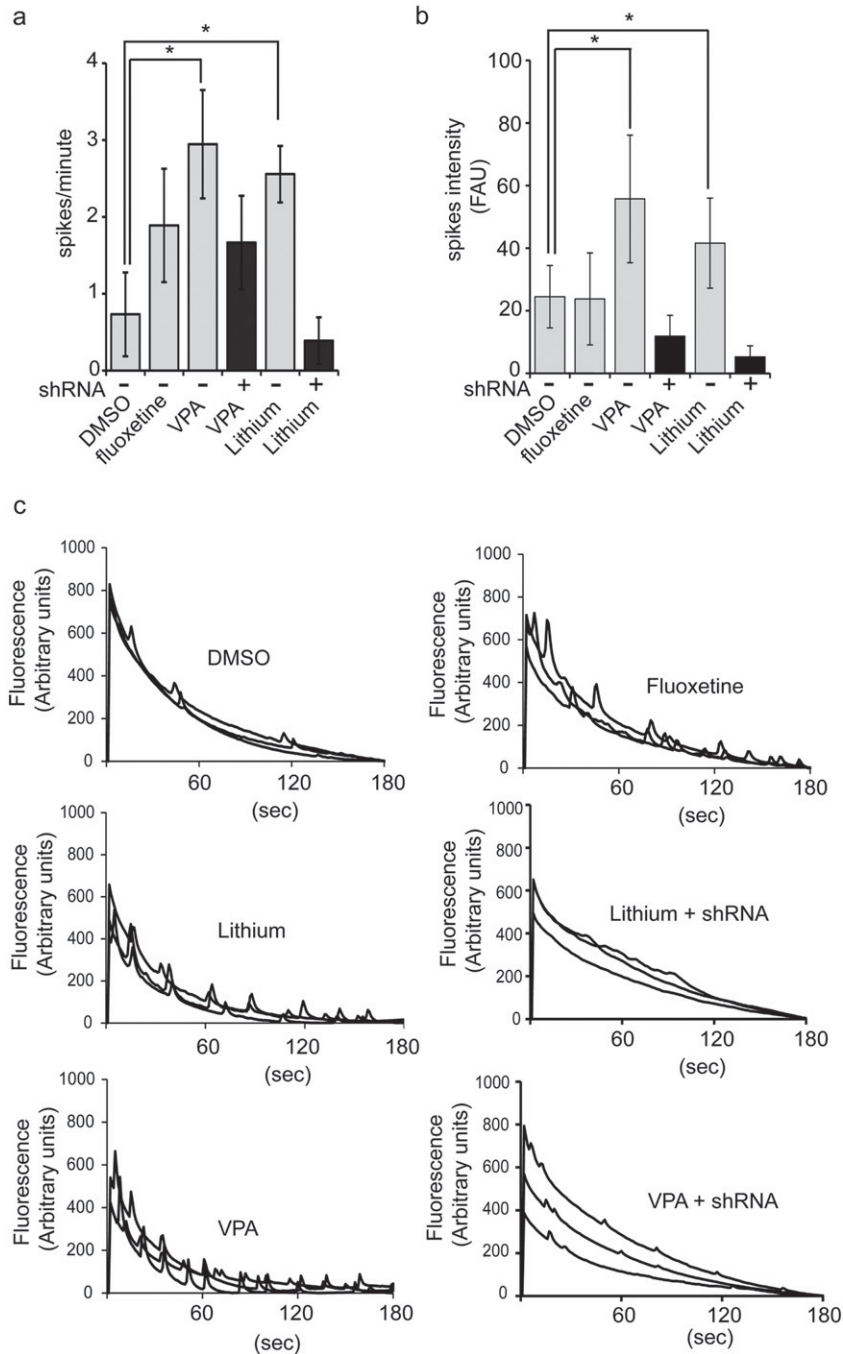


Fig. 3. Functional analysis of neuronal network activity following compounds treatment. a–b) Quantification of spontaneous calcium oscillations (SCO) frequency (spikes/min, a) and intensity (FAU: Fluorescence Arbitrary Units, b) in neurons treated with DMSO, fluoxetine, lithium and valproic acid (VPA). SCO were recorded over a period of 180 s, results represent mean \pm SD of 5–6 biological replicates/treatment. * $p < 0.01$ *t*-test compared to DMSO treated cells. shRNA: neurons stably expressing a cDNA coding for a SHANK3 shRNA c) Representative example of recordings.

genome RNA sequencing revealed that only 331 genes were modified by lithium treatment in SA001 neurons (Fold change $>+1.5$ or -1.5 compared to DMSO treated neurons, $p < 0.05$). In contrast, VPA treatment induced the dysregulation of 2161 genes in the same range (Fig. 4b, c and Table S4).

3.4. Up-regulation of SHANK3 mRNA is dependent of HDAC inhibition but independent on GSK-3 inhibition

Candidate signaling pathways potentially linking VPA and lithium to SHANK3 up-regulation were further investigated. The way each one of

these pharmacological agent exerts its therapeutic activity on neuronal cells is not fully understood since both are suggested to inhibit a large variety of enzyme-dependent cascades (Gould et al., 2004). We therefore decided to investigate commonly targeted signaling pathways. Lithium and VPA are considered as two mood stabilizers sharing at least two important common cellular targets: the Glycogen Synthase Kinases of type 3 (GSK-3) and class I Histone Deacetylases (HDAC) (Wu et al., 2013; Lee et al., 2015; Chen et al., 1999). Involvement of these two pathways in SHANK3 mRNA regulation was investigated by treating SA001-derived neurons using Trichostatin A, a potent and selective HDAC inhibitor, or CHIR99021 a selective GSK-3 inhibitor (Fig. 4d). After 24 h of treatment,

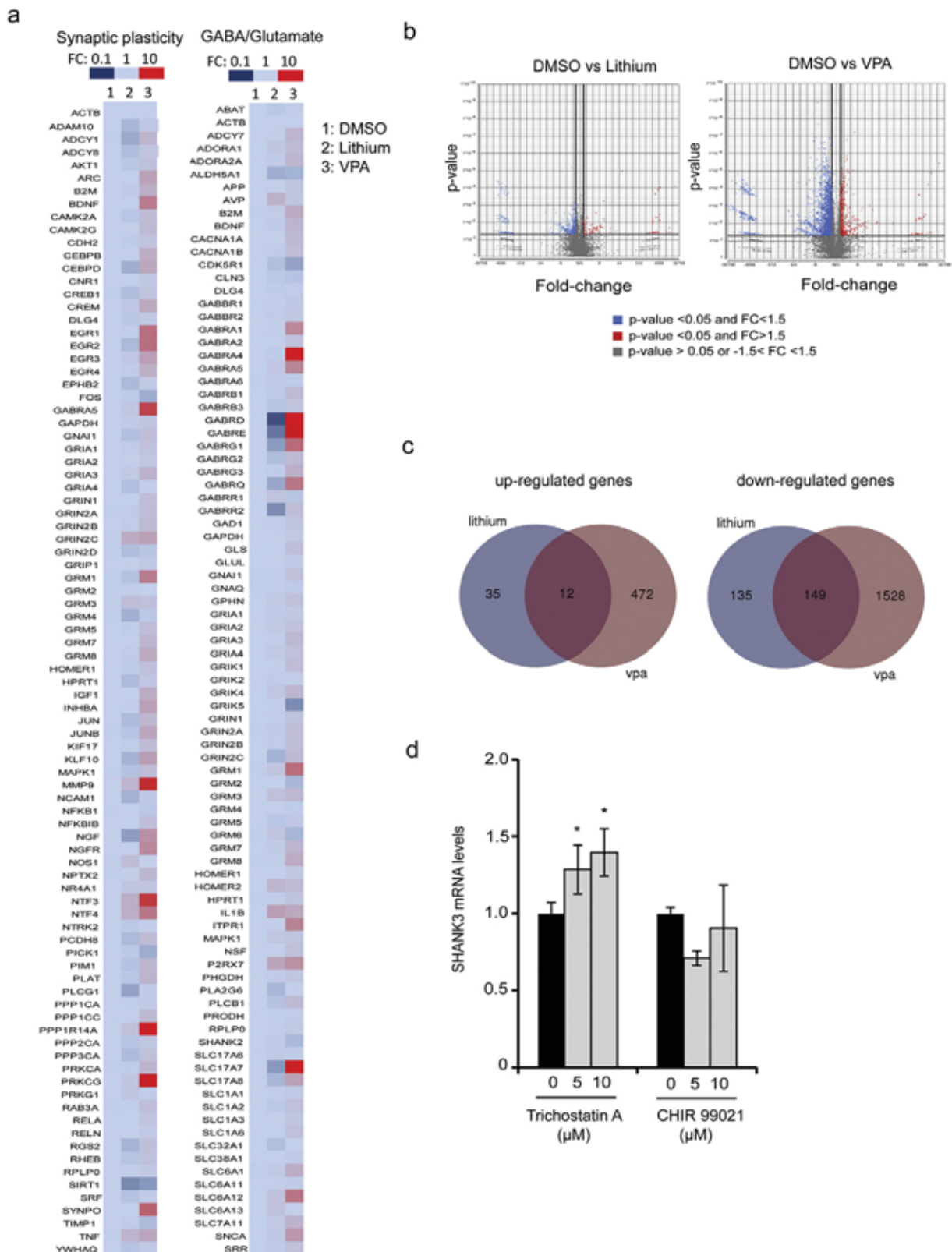
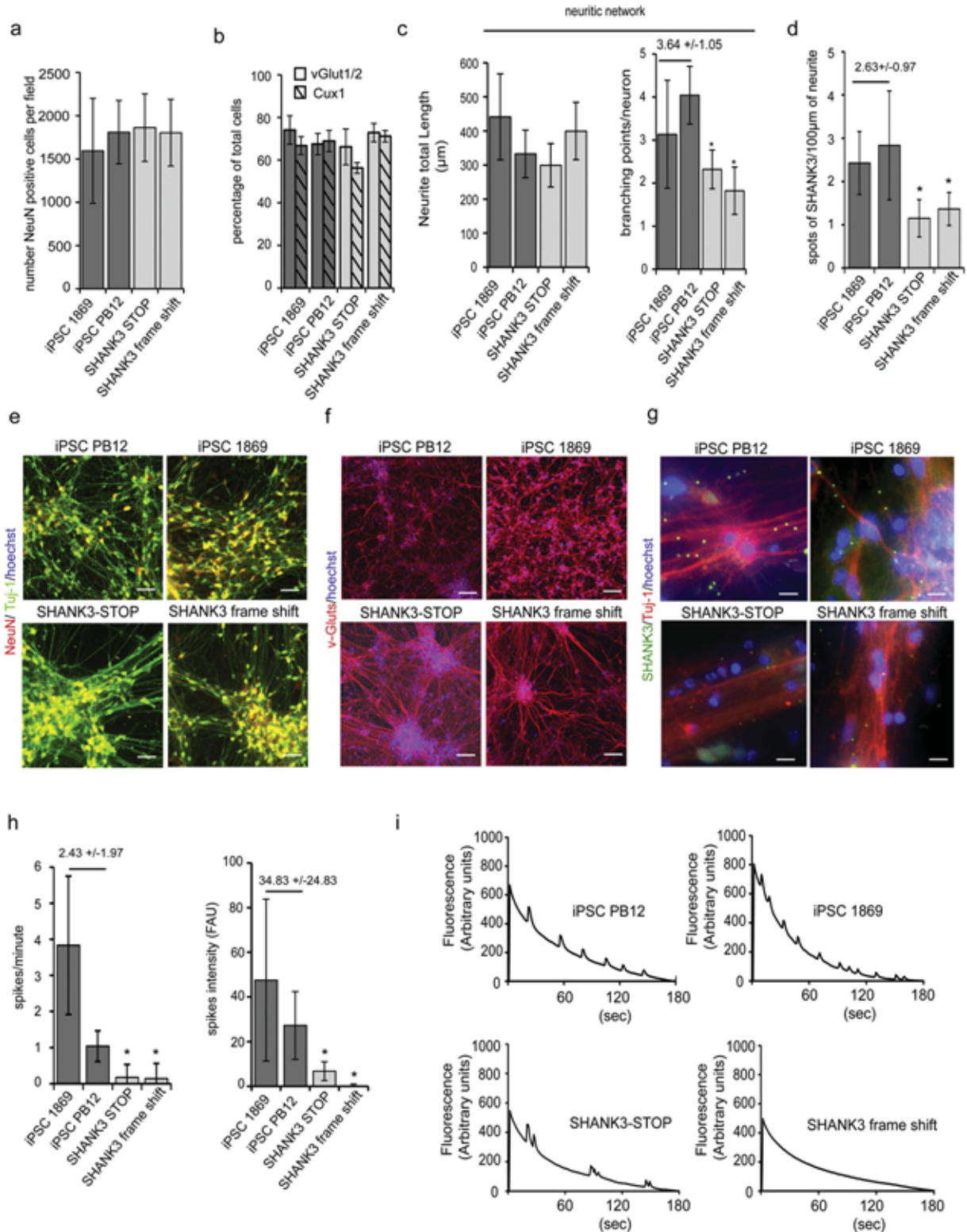


Fig. 4. Molecular targets of VPA and Lithium in human neurons. a) Heat map of gene expression profiles of 150 genes involved in synaptic plasticity or GABA/glutamate pathways in DMSO (column 1), lithium (column 2) or valproic acid (VPA, column 3) treated neurons. FC: Fold change of mRNA expression when compared to DMSO-treated cells. b) Volcano plots showing the distribution of differentially expressed genes in neuronal cultures treated with Lithium or VPA compared to DMSO (p value GSA test < 0.05). Results represent mean of 3 independent neuronal cultures per treatment. c) Venn's Diagram illustrating genes independently or commonly targeted by lithium and VPA treatments. d) Effect of inhibitors of GSK-3 (CHIR 99021) and HDAC (Trichostatin A) dependent pathways on SHANK3 mRNA expression. SHANK3 mRNA levels were quantified 24 h after treatment with 5 or 10 μ M of the indicated inhibitor. PPIA was used as a reference gene. Results are expressed as fold change compared to DMSO treatment (0 μ M) and represent mean \pm SD of 4 independent neuronal cultures per treatment. * $p < 0.05$.

Trichostatin A significantly increased SHANK3 mRNA. In contrast, CHIR99021 was not able to mimic the effect of lithium and VPA on SHANK3 mRNA. In parallel, RNA sequencing data indicated that lithium and VPA commonly up-regulated 12 genes while down-regulating 149 (Fig. 4c, Table S4). This list of gene was further investigated using the pathway enrichment analysis tool PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) via EnrichR. Commonly regulated genes did

not cluster into signaling pathways linked to GSK-3 or any metabolic enzymes directly targeted by lithium or VPA. In contrast, among the 149 down-regulated genes, 5 histone isoforms were identified (HIST1H1B, HIST1H1C, HIST1H2B, HIST1H4A, HIST1H4D, Table S4). Together, this suggested that lithium and VPA-mediated increase of SHANK3 mRNA levels could be triggered via an epigenetic mechanism involving histone regulation.



3.5. Lithium and VPA Action on Neurons Differentiated from iPSC of Patients with SHANK3 Mutations

To evaluate compounds efficacy on SHANK3 haplotypes associated phenotypes, iPSC lines were derived from two children with autism and severe intellectual disabilities who carried two different deleterious mutations in one allele of SHANK3 (SHANK3-STOP and SHANK3 frame-shift, Fig. S4 and Leblond et al., 2014). The two mutations were predicted to lead to loss of function of one of the two alleles of SHANK3, leaving one functional allele. Neurons were first differentiated and compared to neuronal cultures differentiated from two control lines PB12 and 1869 (Fig. 5 and Fig. S4). As described previously, SHANK3 haplo-insufficiency did not significantly influence the rate of neuronal differentiation as determined by quantifying the fraction of the cells expressing the neuronal specific proteins HuC/D (Fig. S4) or NeuN (Fig. 5a and e) and Tuj-1 (Fig. 5e). After 28 days of differentiation, all the culture contained more than 70% of post-mitotic neurons independently of the presence or absence of SHANK3 haplo-insufficiency. In parallel, the fraction of dividing neuronal precursors, characterized by the co-expression of Sox2 and Ki67 were lower than 10% (Fig. S4). SHANK3 haplo-insufficiency did not modify the type of neurons produced that were mostly glutamatergic neurons, expressing vGlut-1/2 (Fig. 5b and f), of the superficial cortical layers (expressing the layer specific marker Cux1, Fig. 5b and Fig. S4, Boissart et al., 2013; Yi et al., 2016). Neuronal phenotypes previously associated with SHANK3 loss of function were then deeply analyzed to determine whether they were robustly recapitulated in neurons differentiated from iPSC of patients with disruptive point mutation in SHANK3 gene. Neuritic network morphology was analyzed by automatically tracking neurite using beta-III tubulin staining (anti-Tuj-1 antibodies, Fig. 5c and e). Analysis of two different neuritic network parameters, i.e. the size of the neuritic network associated with a single neuron (neurite length by neuron) and the way this neuritic network develop complexity (branching point number per neuron) indicated that SHANK3 haplo-insufficiency impacted significantly neurite branching (Fig. 5c and e). Quantification of the density of SHANK3 spots on neurites confirmed that SHANK3 haploinsufficiency was associated with lower SHANK3 expression at synaptic sites since the density was significantly lower in the neuronal cultures differentiated from the two SHANK3 mutated iPSC lines (Fig. 5d, g). Together, this led to deficient neuronal connectivity as revealed by decreased intensities and frequencies of SCOs recorded in the two patient-derived neuronal cultures after 42 days of differentiation (Fig. 5h, i).

The recapitulation of SHANK3 deficiency associated phenotypes in neurons of patients with disruptive point mutations allowed us to use them as a biological support to test the efficiency of VPA and lithium. Neurons with SHANK3 mutations were treated with VPA or lithium during 120 h. The two drugs had only a slight effect on neurite branching (Fig. 6a) but significantly increased the number of SHANK3-containing synapses (Fig. 6b, d) as well as SCOs frequency and intensity in the two SHANK3 genetic backgrounds (Fig. 6c, e). This suggested that

these two compounds may be of beneficial for patients from whom the iPSC were derived.

3.6. Clinical Assessment of Lithium Treatment on ASD Severity in a SHANK3-STOP Patient

Patient AUN-003, from whom the iPSC line SHANK3-STOP was derived (*de novo* truncating mutation P.Glu809X) was enrolled in 2012, aged 12 years old, in an observational clinical study (Fig. 7, T0). She had a severe ASD measured with the Social Responsiveness Scale (SRS, raw score = 101, t-score = 89), the Autism Diagnosis Observational Scale (ADOS, social affect domain raw score = 23) and the Autism Diagnosis Interview-Revised version (data not shown). She displayed a mild intellectual disability with contrasting results on the Peabody Picture Vocabulary Test (PPVT) (t-score: 101) and the Raven's progressive matrices (RPM) (raw score = 9, t-score: <65). However, her adaptive behavior was below her cognitive ability based on the Vineland's module 2 (communication domain raw score = 41) or the Global Assessment Scale (GAS, raw score = 30). At T0, by screening her psychiatric comorbidity with the Kiddie SADS, a semi-structured interview, patient AUN-003 had no lifetime history of Attention Deficit Hyperactive Disorder (ADHD) or of bipolar affective disorders (including manic symptoms). Seven months later (Fig. 7, black arrow), she developed symptoms of mood deregulation. During several months, she displayed major depressive symptoms followed by a hypomanic episode with mixed features. The maximum intensity of manic symptoms was retrospectively assessed with the Young-Mania rating Scale (Y-MRS, raw score = 26). Five months later, (Fig. 7, red arrow), facing inability to control the symptoms, lithium was introduced as an indication for bipolarity. Considering the *in vitro* results obtained on her iPSC derived neurons, ASD scores were carefully assessed. After 8 months of treatment (T1), she displayed a clear improvement on manic symptoms (Y-MRS raw score = 18). In addition, a modest but significant positive effect was identified on ASD severity, as evaluated by the SRS (raw score = 84, t-score = 80), as well as on her cognitive performance measured with the RPM (raw score = 13, t-score < 70). However, the adaptive behavior was not improved whatever the scale considered (GAS = 25, Vineland communication domain score = 31). After one year (T2) adaptive behavior started to improve as compared to T1, though still close to the performance at T0 (GAS = 30, Vineland score = 35), i.e. before regression. In contrast, the caregivers reported additional reduction of autistic symptoms on the SRS (raw score = 73, t-score = 75), which was further confirmed by results on the ADOS (social affect domain raw score = 17). These two tests revealed that ASD symptoms were lower than before regression. In contrast, there has been a degradation of her ability to control her impulsivity between T1 and T2, associated to distractibility. Caregivers mentioned that these symptoms differed from those observed during the manic episodes. Despite their late onset, symptoms tended to evoke clinical features of ADHD (ADHD-

Fig. 5. Neurons differentiated from patients with SHANK3 mutations recapitulate cellular phenotypes associated to SHANK3 haploinsufficiency. a) Quantification of the number of neurons (NeuN/Tuj-1 double positive cells) per field of 330 μm^2 , in control (1869 and PB12) and SHANK3 mutated (SHANK3 STOP and SHANK3 frame shift) lines. Results represent mean \pm SD of at least 6 independent differentiations, with a minimum 10 fields per culture. b) Quantification of neuronal sub-type present in 28 days neuronal culture obtained from controls or SHANK3 cells. vGlut1/2 expression indicated glutamatergic neurons and Cux-1 expression marked cortical glutamatergic neurons of the superficial layers. Results are mean \pm SD of 3 independent differentiations. c) Quantification of neuritic network parameters in control (iPSC 1869 and iPSC PB12) and SHANK3 mutated (SHANK3-STOP and SHANK3 frame shift) 28 days-old neuronal cultures. Neurite total length represents the size in μm of the neuritic network associated with one neuron while the number of branching points quantifies more specifically neurite network complexity. Results represent mean \pm SD of at least 6 independent neuronal cultures per line. d) Quantification of SHANK3 synaptic content in neurons derived from control (1869 and PB12) or SHANK3 mutated lines. Data are reported as the density of spots per 100 μm of neurite. Results represent mean \pm SD of 4 independent neuronal cultures per line. e) Representative images of the neuronal density (NeuN positive cells) and of the neuritic network revealed using beta-III tubulin staining (Tuj-1 antibodies) in control and SHANK3 neuronal cultures. Scale bar = 50 μm . f) Representative images of the v-Gluts (mixed antibodies recognizing v-Glut1 and v-Glut-2) staining in control and SHANK3 neuronal cultures. Scale bar = 100 μm . g) Representative images of SHANK3 spots on neurite of control and SHANK3 neurons. Scale bar = 20 μm . h) Quantification of spontaneous calcium oscillation frequency (spike/min) and intensity (F.A.U: Fluorescence Arbitrary Units), reflecting neuronal network activity, in control (PB12 and 1869) and in SHANK3 mutated (SHANK3-STOP and SHANK3 frame-shift) in 42 days-old neuronal culture. Results represent mean \pm SD of recording of at least 6 neuronal cultures per lines. In panel c, d and h, values above the two dark grey bars represent the mean \pm SD of the two control lines. *: $p < 0.05$, control lines vs the indicated SHANK3 mutated line. i) Representative recording of calcium oscillations in control and SHANK3 neuronal cultures.

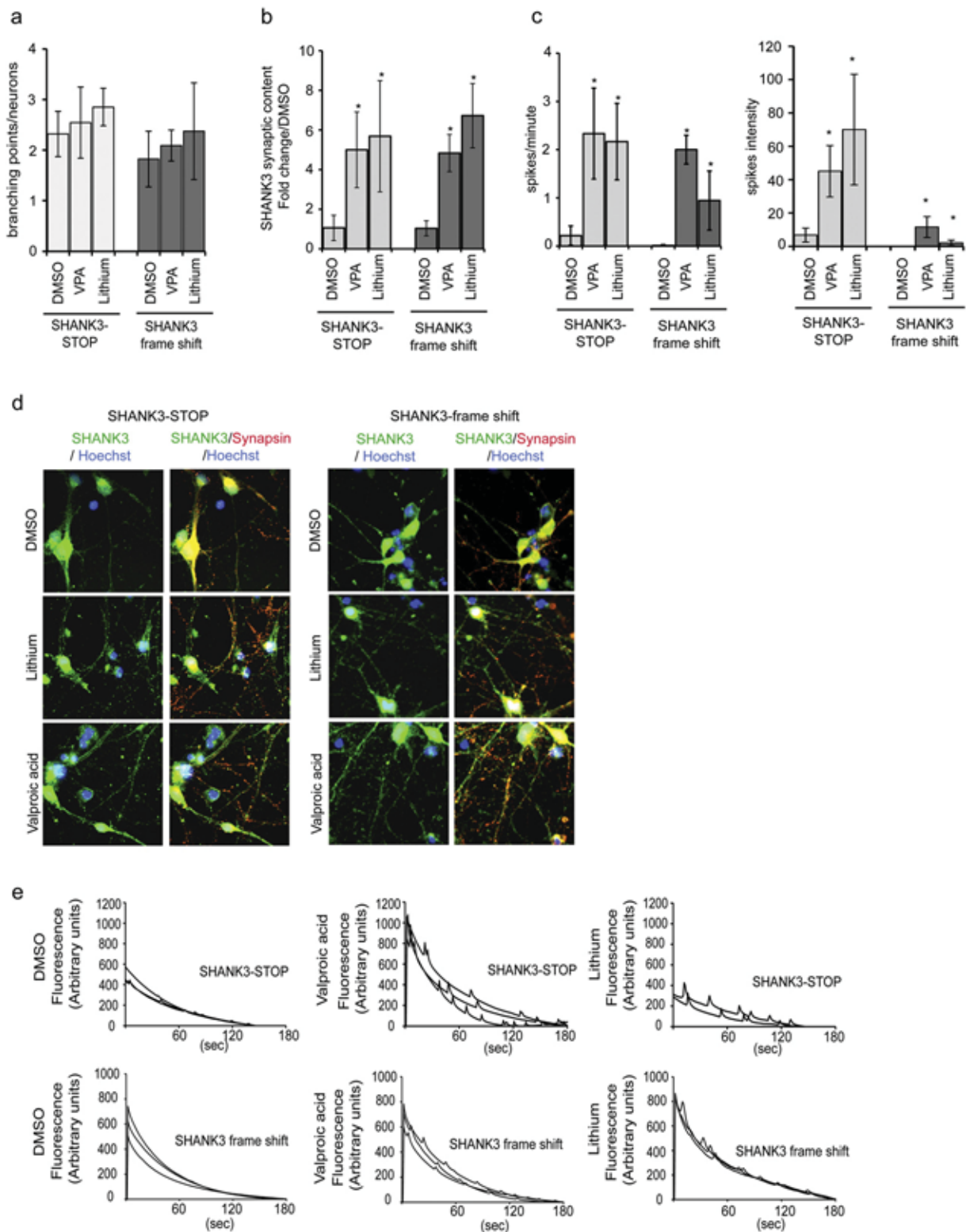


Fig. 6. VPA and Lithium treatment efficiency in neurons with SHANK3 mutations. a) Quantification of the number of neurite branching points of neurons derived from SHANK3 mutated lines after lithium and VPA treatments. Results represent mean \pm SD of 3 independent differentiation/treatment. b) Quantification of SHANK3 synaptic content in neurons derived from iPSC individuals bearing the two different SHANK3 mutations (SHANK3-STOP and SHANK3 frame shift) after 120 h treatment with valproic acid (VPA) or lithium. Results are presented as fold change variations compared to DMSO-treated cells and represented as mean \pm SD of at least 6 independent biological replicates/treatment. c) Quantification of spontaneous calcium oscillation frequency and intensity in SHANK3 mutated lines (SHANK3-STOP and SHANK3 frame-shift) with or without treatment with VPA or lithium. Data represent mean \pm SD of 4 independent neuronal cultures per treatment. * $p < 0.01$ Lithium or VPA vs DMSO. d) Representative images of SHANK3 and Synapsin expression in DMSO, VPA and Lithium treated neurons. e) Representative recording of calcium oscillations.

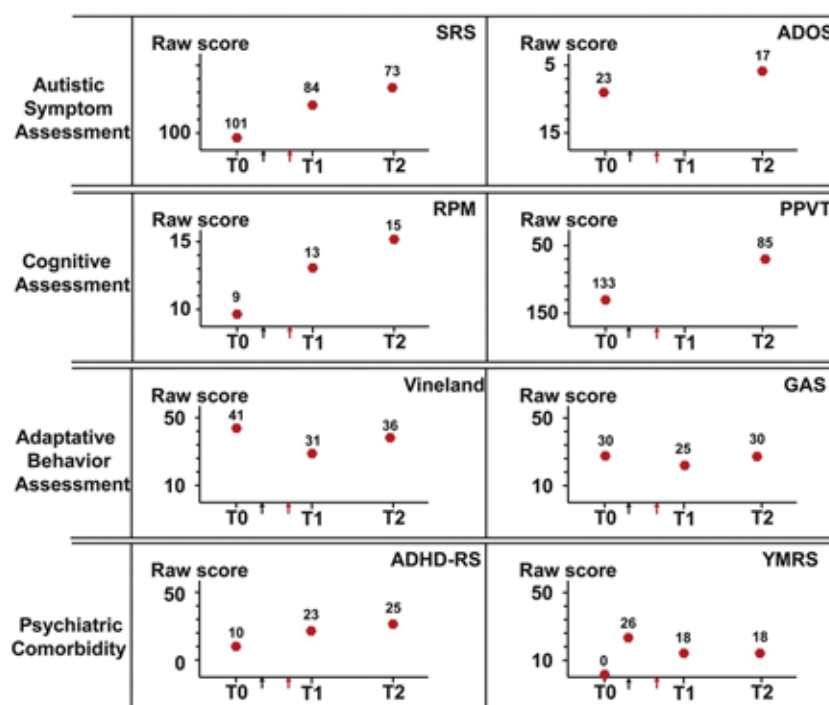


Fig. 7. Clinical assessment of patient AUN-003 (SHANK3-STOP). T0: Patient AUN-003 aged 12 years old, was enrolled in the study (2012). Black arrow: she developed symptoms of mood deregulation and regression. Red Arrow: start of lithium treatment (0.6 mL–1000 mg/d). T1: 8 months follow-up, T2: one year follow-up. SRS: Social Responsiveness Scale, ADOS: Autism Diagnosis Observational Scale, RPM: Raven's progressive matrices, PPVT: Peabody Picture Vocabulary Test, GAS: Global Assessment Scale, ADHD-RS: Attention deficit associated to hyperactivity disorder rating Scale, Y-MRS: Young-Mania rating Scale.

RS, global raw score = 25). Table S5 reports in details the scores obtained for each tests and each sub-categories.

4. Discussion

SHANK3 haplo-insufficiency induced by heterozygous loss of function mutations represents a clear model of abnormal gene dosage leading to ASD (Durand et al., 2007; Yi et al., 2016) that can be reversed by genetically re-introducing SHANK3 normal levels of expression, including during adulthood, in mice models (Shcheglovitov et al., 2013). (Mei et al., 2016). We therefore proposed that successful therapeutic compounds for SHANK3 haplo-insufficiency dependent form of ASD could be identified based on their potential to up-regulate this gene in human neurons. We first selected potential hit compounds using control hESC derived neurons, to avoid epigenetic bias potentially induced by iPSC reprogramming (Urbach et al., 2010; Lister et al., 2011). Patient-derived iPSC cellular models were then used to challenge their efficacy at corrected SHANK3-associated neuronal phenotypes considered as relevant for ASD symptoms (Bozdagi et al., 2010; Yi et al., 2016). Interestingly, among the compounds regulating SHANK3 identified in the present study were the two mood stabilizers VPA and lithium that share common cellular targets. Additionally, we reported promising results of lithium pharmacotherapy to reduce ASD core symptoms in one of the patient from whom iPSC were produced. Supporting our observations, lithium was previously shown to overcome neonatal isolation-induced autistic-like behavior in a rat model by restoring the compromised balance between excitatory/inhibitory synaptic activities (Wu et al., 2014). Lithium was also proposed as a potential therapeutic approach for Fragile X syndrome. Chronic lithium treatment contributes to normalized behavior and synaptic transmission in mice models of Fragile X syndrome and pilot clinical trials have shown promising results in individuals with Fragile X syndrome (Liu and Smith, 2014). This suggests that lithium may have a global positive effect on glutamatergic synapse genesis and homeostasis. This would be consistent

with mRNA profiling performed in the present study, which indicate that lithium positively regulates SHANK3 together with 6 of its protein-partners at the glutamatergic synapse. How lithium regulates SHANK3 remains, however, to be fully characterized as lithium acts on a large variety of signaling pathways (Wu et al., 2013; Pasquali et al., 2010; Millan, 2013). Our results suggest that lithium, as VPA, may act, in part, through its HDAC inhibitory activity and regulate SHANK3 via an epigenetic mechanism. Lithium was demonstrated to inhibit inositol dependent enzymes by depleting inositol cellular content (Gould et al., 2004). Interestingly, HDAC were recently demonstrated as depending of inositol for proper activity (Watson et al., 2016). This suggests that Lithium may directly inhibit HDAC activity via inositol depletion. In addition, we found that Lithium, as VPA, down-regulated directly histone expression. Together, lithium and VPA may regulate SHANK3 at an epigenetic levels via several pathways linked to histone linkage to DNA. Clinical assessment of patient AUN-003 suggested that lithium, initially provided for bipolar disorders, improved also her social and interaction behavior as evaluated using SRS and ADOS. Interestingly, after one year of treatment, performances on SRS and ADOS were better than when she was first enrolled in the study 2.5 years before (T0), i.e. before the beginning of mood deregulation. These effects on scales exploring ASD were not correlated with performance on global adaptation behavior scales (Vineland and GAS), suggesting that the improvement recorded for ASD symptoms was not, at least not only due to a recovery from regression or a placebo effect. While encouraging, our case report also revealed the emergence of ADHD in this patient that should serve as a cautionary tale for the premature use of this approved medication for a complex condition such as ASD. These symptoms resembled the hyperkinetic, manic-like, disorders described previously in two patients with SHANK3 duplication and mimicked in SHANK3 overexpressing mice (Han et al., 2013). In this mouse model, lithium was inefficient at correcting SHANK3 dependent maniac-like behavior, in contrast to VPA, an atypical pharmacological profile for manic-like disorders. In light of our results, the up-regulation of SHANK3 by lithium may explain

the lack of efficacy. Regarding VPA, additional action of this compound on the GABAergic system may overall result in a correction of the manic-like behavior despite up-regulating *SHANK3*. Collectively, this suggests that lithium may have improved ASD symptoms but induced ADHD-like behavior by increasing *SHANK3* in AUN-003. These observations highlight the fact that proper *SHANK3* dosage is critical for normal brain function, and warrant deeper investigation of the mechanisms of action of lithium, VPA and related agents and their potential benefits for patients with *SHANK3* haplo-insufficiency. Our work pleads for a deeper characterization of instrumental pathways sustaining lithium action on *SHANK3* to identify more specific molecules and avoid potential non-desired side effects resulting from the inhibition of multiple cellular targets not involved in *SHANK3* regulation. Additionally, animal testing will be critical to elucidate lithium efficacy. So far, the most widely studied models are mice fully knock-out for *SHANK3* isoforms. These mice exhibit strong and robust abnormal behavior (review in Jiang and Ehlers, 2013). Consistently, validation of pharmacological approaches preferentially uses these KO mice (Bozdagi et al., 2013; Bidinosti et al., 2016). However, our approach is based upon the identification of compounds rescuing *SHANK3* associated phenotypes by increasing *SHANK3* mRNA levels. Testing of lithium would therefore need to be performed in heterozygous mice with one wild-type allele. Unfortunately, these mice develop only very specific and discrete phenotypes (Bozdagi et al., 2010), the robustness of which limiting their use as model for testing efficiency of pharmacological approaches. Finally, formal conclusions would come from a randomized double blind clinical trial against placebo that will be needed to accurately validate the effect of lithium in patients carrying *SHANK3* loss of function mutations and exclude any possibility of symptom improvement solely due to change in educational care or any other environmental factors.

5. Conclusion

The main result of this study is the demonstration that lithium, the FDA-approved drug for bipolar disorders, regulates *SHANK3* expression in a way that bears therapeutic potential for patients with ASD associated to *SHANK3* haploinsufficiency. This result has been obtained on the basis of a drug screening challenging molecular and functional phenotypes relevant to the disease in neurons derived from pluripotent stem cell lines, including from patients awaiting a treatment. This novel methodology for drug discovery is applicable to other forms of ASD with contrasting pathophysiological substrates, as well as to other CNS disorders with known molecular anomalies. As such, it offers an avenue to the stratification of treatment and, ultimately, personalized medicine for psychiatric disorders.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.05.032>.

Contributors

Conception and design of the study: AB, MP, TB, RD; Screening and *in vitro* experimental design: HD, AP, AB, LC, CB, FC, MJM; Data collection, analysis and interpretation: HD, AP, FRA, LC, CB, JP, TB, RD, AB; Compound library design and providing: HD, MJM, FC, AB; Transcriptomic studies: ALP, MJ, Patients recruitment, genetic characterization and sampling: CN, TB, RD; Patients clinical evaluation and post-treatment follow-up: FRA, RD; Report first draft writing: HD, AB; Critical review and editing, MJM, TB, MP, RD. Study supervision: AB.

Funding

Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon), French National Health Institute (INSERM), French National Research Agency (ANR), Bettencourt-Schueller Foundation, Cognacq Jay Foundation, Fondamental Foundation, Servier Laboratories.

Role of the Funding Sources

Funders of the study had no role in study design, data analysis, data interpretation, or writing of the report. All authors had full access to the data and were jointly responsible for the decision to submit the manuscript.

Acknowledgements

The authors are thankful to I-Stem's HTS platform staff for constant technical support. We thank the cell bank of Pitié-Salpêtrière hospital and the Clinical Investigation Center of Robert Debré hospital for assistance with patient recruitment, information, sampling and fibroblast preparation. H.D. received a PhD grant from Servier's Laboratories. I-Stem is part of the Biotherapies Institute for Rare Diseases (BIRD) supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon). This study has been in part funded by grants from "Investissements d'Avenir" – (ANR-11-INBS-0009 - INGESTEM – and ANR-11-INBS-0011 - NeurATRIS), the French National Research Agency ANR (ANR-13-SAMA-0006; SynDivAutism), the Laboratory of Excellence GENMAD (ANR-10-LABX-0013), the Bettencourt-Schueller Foundation, the Cognacq Jay Foundation, and the Fondamental Foundation. This study used samples from the NINDS Human Genetics Resource Center DNA and Cell Line Repository, as well as clinical data. NINDS Repository sample numbers corresponding to the samples used are GM 1869.

References

- Bidinosti, M., Botta, P., Kruttner, S., et al., 2016. CLK2 inhibition ameliorates autistic features associated with *SHANK3* deficiency. *Science* 351 (6278), 1199–1203.
- Bittker, J.A., 2012. High-throughput RT-PCR for small-molecule screening assays. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* 4 (1), 49–63.
- Boeckers, T.M., Bockmann, J., Kreutz, M.R., Gundelfinger, E.D., 2002. ProSAP/Shank proteins – a family of higher order organizing molecules of the postsynaptic density with an emerging role in human neurological disease. *J. Neurochem.* 81 (5), 903–910.
- Boissart, C., Nissan, X., Giraud-Triboulet, K., Peschanski, M., Benchoua, A., 2012. miR-125 potentiates early neural specification of human embryonic stem cells. *Development* 139 (7), 1247–1257.
- Boissart, C., Poulet, A., Georges, P., et al., 2013. Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening. *Transl. Psychiatry* 3, e294.
- Bourgeron, T., 2015. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat. Rev. Neurosci.* 16 (9), 551–563.
- Bozdagi, O., Sakurai, T., Papapetrou, D., et al., 2010. Haploinsufficiency of the autism-associated *Shank3* gene leads to deficits in synaptic function, social interaction, and social communication. *Mol. Autism* 1 (1), 15.
- Bozdagi, O., Tavassoli, T., Buxbaum, J.D., 2013. Insulin-like growth factor-1 rescues synaptic and motor deficits in a mouse model of autism and developmental delay. *Mol. Autism* 4 (1), 9.
- Cao, Z., Zou, X., Cui, Y., et al., 2015. Rapid throughput analysis demonstrates that chemicals with distinct seizurogenic mechanisms differentially alter Ca²⁺ dynamics in networks formed by hippocampal neurons in culture. *Mol. Pharmacol.* 87 (4), 595–605.
- Chen, G., Huang, L.D., Jiang, Y.M., Manji, H.K., 1999. The mood-stabilizing agent valproate inhibits the activity of glycogen synthase kinase-3. *J. Neurochem.* 72 (3), 1327–1330.
- Chen, E.Y., Tan, C.M., Kou, Y., et al., 2013. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinf.* 14, 128.
- Delorme, R., Ey, E., Toro, R., Leboyer, M., Gillberg, C., Bourgeron, T., 2013. Progress toward treatments for synaptic defects in autism. *Nat. Med.* 19 (6), 685–694.
- David, S.M., Murray, T.F., 2004. Spontaneous synchronized calcium oscillations in neocortical neurons in the presence of physiological [Mg²⁺]: involvement of AMPA/kainate and metabotropic glutamate receptors. *Brain Res.* 1006 (1), 8–17.
- Durand, C.M., Betancur, C., Boeckers, T.M., et al., 2007. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein *SHANK3* are associated with autism spectrum disorders. *Nat. Genet.* 39 (1), 25–27.
- Georges, P., Boissart, C., Poulet, A., Peschanski, M., Benchoua, A., 2015. Protein kinase-A inhibition is sufficient to support human neural stem cells self-renewal. *Stem Cells*.
- Gould, T.D., Quiroz, J.A., Singh, J., Zarate, C.A., Manji, H.K., 2004. Emerging experimental therapeutics for bipolar disorder: insights from the molecular and cellular actions of current mood stabilizers. *Mol. Psychiatry* 9 (8), 734–755.
- Grabrucker, A.M., Knight, M.J., Proepper, C., et al., 2011. Concerted action of zinc and ProSAP/Shank in synaptogenesis and synapse maturation. *EMBO J.* 30 (3), 569–581.
- Han, K., Holder Jr., J.L., Schaaf, C.P., et al., 2013. *SHANK3* overexpression causes manic-like behaviour with unique pharmacogenetic properties. *Nature* 503 (7474), 72–77.
- Jiang, Y.H., Ehlers, M.D., 2013. Modeling autism by *SHANK* gene mutations in mice. *Neuron* 78 (1), 8–27.

- Kumar, R.A., Christian, S.L., 2009. Genetics of autism spectrum disorders. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 9 (3), 188–197.
- Leblond, C.S., Nava, C., Polge, A., et al., 2014. Meta-analysis of SHANK mutations in autism spectrum disorders: a gradient of severity in cognitive impairments. *PLoS Genet.* 10 (9), e1004580.
- Lee, R.S., Pirooznia, M., Guintivano, J., et al., 2015. Search for common targets of lithium and valproic acid identifies novel epigenetic effects of lithium on the rat leptin receptor gene. *Transl. Psychiatry* 5, e600.
- Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y.S., et al., 2011. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471 (7336), 68–73.
- Liu, Z., Smith, C.B., 2014. Lithium: a promising treatment for fragile X syndrome. *ACS Chem. Neurosci.* 5 (6), 477–483.
- Mei, Y., Monteiro, P., Zhou, Y., et al., 2016. Adult restoration of Shank3 expression rescues selective autistic-like phenotypes. *Nature* 530 (7591), 481–484.
- Millan, M.J., 2013. An epigenetic framework for neurodevelopmental disorders: from pathogenesis to potential therapy. *Neuropharmacology* 68, 2–82.
- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., et al., 2008. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* 26 (1), 101–106.
- Newschaffer, C.J., Croen, L.A., Daniels, J., et al., 2007. The epidemiology of autism spectrum disorders. *Annu. Rev. Public Health* 28, 235–258.
- Pasquali, L., Busceti, C.L., Fulceri, F., Paparelli, A., Fornai, F., 2010. Intracellular pathways underlying the effects of lithium. *Behav. Pharmacol.* 21 (5–6), 473–492.
- Peca, J., Feliciano, C., Ting, J.T., et al., 2011. Shank3 mutant mice display autistic-like behaviours and striatal dysfunction. *Nature* 472 (7344), 437–442.
- Pick, M., Stelzer, Y., Bar-Nur, O., Mayshar, Y., Eden, A., Benvenisty, N., 2009. Clone- and gene-specific aberrations of parental imprinting in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27 (11), 2686–2690.
- Sehgal, P.B., Darnell Jr., J.E., Tamm, I., 1976. The inhibition by DRB (5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole) of hnRNA and mRNA production in HeLa cells. *Cell* 9 (3), 473–480.
- Shcheglovitov, A., Shcheglovitova, O., Yazawa, M., et al., 2013. SHANK3 and IGF1 restore synaptic deficits in neurons from 22q13 deletion syndrome patients. *Nature* 503 (7475), 267–271.
- Spooren, W., Lindemann, L., Ghosh, A., Santarelli, L., 2012. Synapse dysfunction in autism: a molecular medicine approach to drug discovery in neurodevelopmental disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* 33 (12), 669–684.
- Toro, R., Konyukh, M., Delorme, R., et al., 2010. Key role for gene dosage and synaptic homeostasis in autism spectrum disorders. *Trends Genet.* 26 (8), 363–372.
- Urbach, A., Bar-Nur, O., Daley, G.Q., Benvenisty, N., 2010. Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 6 (5), 407–411.
- Watson, P.J., Millard, C.J., Riley, A.M., et al., 2016. Insights into the activation mechanism of class I HDAC complexes by inositol phosphates. *Nat. Commun.* 7, 11262.
- Wu, X., Bai, Y., Tan, T., et al., 2014. Lithium ameliorates autistic-like behaviors induced by neonatal isolation in rats. *Front. Behav. Neurosci.* 8, 234.
- Wu, S., Zheng, S.D., Huang, H.L., et al., 2013. Lithium down-regulates histone deacetylase 1 (HDAC1) and induces degradation of mutant huntingtin. *J. Biol. Chem.* 288 (49), 35500–35510.
- Yi, F., Danko, T., Botelho, S.C., et al., 2016. Autism-associated SHANK3 haploinsufficiency causes Ih channelopathy in human neurons. *Science*.