



HAL
open science

Développement d'un modèle cellulaire de motoneurones humains à partir de cellules iPS pour l'étude des mécanismes physiopathologiques et l'analyse fonctionnelle d'un variant de séquençage impliqué dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth

Julien Carras

► To cite this version:

Julien Carras. Développement d'un modèle cellulaire de motoneurones humains à partir de cellules iPS pour l'étude des mécanismes physiopathologiques et l'analyse fonctionnelle d'un variant de séquençage impliqué dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth. Sciences du Vivant [q-bio]. 2023. hal-04325460

HAL Id: hal-04325460

<https://ephe.hal.science/hal-04325460v1>

Submitted on 6 Dec 2023

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

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



École Pratique
des Hautes Études

PSL 

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA
RECHERCHE ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté par

CARRAS Julien

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

Développement d'un modèle cellulaire de motoneurones humains à partir de cellules iPS pour l'étude des mécanismes physiopathologiques et l'analyse fonctionnelle d'un variant de séquençage impliqué dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth

soutenu le 26/10/2023 devant le jury suivant :

Madame le Docteur FRACHET Véronique – Président

Monsieur le Professeur SCHAEFFER Laurent – Tuteur scientifique

Monsieur le Docteur ARNAUD Frederick – Tuteur pédagogique

Madame le Docteur MAGDINIER Frédérique – Rapporteur

Madame le Docteur MARTINAT Cécile – Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

M. SCHAEFFER Laurent

Intitulé de la structure d'accueil : *Institut NeuroMyoGene - Pathophysiology and Genetics of Neuron and Muscle (INMG-PGM). 8 avenue Rockefeller 69008 Lyon*

Directeur : *M. SCHAEFFER Laurent*

et de

M. ARNAUD Frederick

Intitulé de la structure d'accueil EPHE-PSL : *UMR 754 "Infections Virales et Pathologie Comparée. 50 Avenue Tony Garnier 69007 Lyon*

Directrice : *Dr. Fabienne ARCHER*



Remerciements

Je remercie en premier lieu **Monsieur le Professeur Laurent SCHAEFFER**, qui m'a permis de réaliser ce diplôme et m'a accueilli dans son institut de recherche. Merci d'avoir accepté d'être mon tuteur et d'avoir consacré du temps à ce mémoire.

Je remercie également **Monsieur le Docteur Frédérick ARNAUD**, qui a su me conseiller pour construire mon parcours à l'EPHE. Je te remercie pour la correction et les conseils pour le CCR et le mémoire.

Je remercie tout particulièrement **Monsieur le Docteur Arnaud JACQUIER** qui, durant ces trois années, m'a formé sur les différentes techniques et a su se rendre disponible pour m'orienter dans mon projet et répondre à mes questions.

J'adresse mes remerciements aux **membres du jury**, de m'avoir fait l'honneur d'évaluer l'aboutissement de mes travaux à l'issue de ces 3 années de diplôme.

Je tiens à remercier **Monsieur le Docteur COUDERT**, qui a été un binôme exceptionnel. Merci d'avoir répondu présent quand les manips iPS ne voulaient plus fonctionner et pris le relais durant mes absences. Nous avons ensemble mis en place de beaux modèles de culture dans la bonne humeur. Merci pour le temps passé à me former.

Je tiens à remercier **Monsieur le Docteur THEURIET**, pour l'optimisme et l'énergie déployés pour remonter la manip des RACH et de m'avoir soutenu dans les longues manips de différenciation. Ce fut un plaisir de travailler ensemble et de pouvoir partager les courses à pied de bonne heure le matin.

A **Lucas LEMARIE**, je te remercie pour nos échanges et pour ton enthousiasme. Ce fut un plaisir de collaborer sur nos petites puces silicones.

A **Adèle HENNICK**, merci pour le partage de connaissances et de techniques. Mes motoneurons sont incontestablement les plus beaux et sans mycoplasme !

Je remercie **Valérie RISSON**, pour ses explications sur le CRISPR. Je n'ai malheureusement pas encore eu le temps de m'initier à cette technique mais j'espère que nous aurons prochainement l'occasion de voir cela ensemble.

J'adresse mes remerciements à **Madame GROSJEAN Isabelle**, pour m'avoir transmis une partie de son savoir sur les cellules iPS et pour m'avoir intégré dans les formations de la plateforme de l'INMG.

Je remercie également **Monsieur POYAU et Madame le Docteur ROUVET**, pour m'avoir convaincu que j'avais les capacités pour faire ce diplôme et pour m'avoir permis de me lancer dans l'aventure.

A toute **l'équipe SCHAEFFER**, merci pour votre bonne humeur et votre entraide. Ces 3 années ont été riches en rencontres et en enrichissements scientifiques grâce à vous.

Je remercie **Clément EMPTAZ**, pour ton aide et tes conseils pour l'écriture de ce mémoire.

A ma mère, mon père et mon beau-père, je vous remercie d'avoir lu et relu mon mémoire pour corriger les fautes.

A ma compagne, merci pour ton soutien durant ces trois années de diplôme. Merci d'avoir supporté mes humeurs, mon stress et les longues journées d'absence. Je te remercie également d'avoir géré la maison et notre petit Aodren ! Nous allons pouvoir souffler un peu et prévoir de nouvelles aventures avec la fin de ces études.

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| REMERCIEMENTS | 1 |
| TABLE DES FIGURES | 5 |
| TABLE DES TABLEAUX | 8 |
| LISTE DES ABREVIATIONS | 10 |
| I. INTRODUCTION | 12 |
| II. RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES | 13 |
| A. LE SYSTEME NERVEUX PERIPHERIQUE | 13 |
| a. <i>Développement embryonnaire</i> | 14 |
| b. <i>Organisation du système nerveux périphérique</i> | 15 |
| c. <i>Rôle du système nerveux périphérique</i> | 15 |
| d. <i>Composition cellulaire du SNP</i> | 16 |
| A. LES MOTONEURONES | 17 |
| a. <i>Caractéristiques morphologiques</i> | 18 |
| b. <i>Les dendrites</i> | 18 |
| c. <i>L'axone</i> | 19 |
| d. <i>Les synapses</i> | 19 |
| B. LES CELLULES DE SCHWANN | 20 |
| a. <i>Développement des cellules de Schwann</i> | 20 |
| b. <i>Fonction des cellules de Schwann</i> | 21 |
| C. LE MUSCLE SQUELETTIQUE STRIE | 22 |
| D. LA MALADIE DE CHARCOT-MARIE-TOOTH | 23 |
| a. <i>Clinique/Epidémiologie</i> | 23 |
| b. <i>Diagnostic</i> | 24 |
| c. <i>Classification des CMT</i> | 25 |
| E. CAS DE CMT2CC | 26 |
| F. LES NEUROFILAMENTS | 27 |
| a. <i>Structure des neurofilaments</i> | 28 |
| b. <i>Modifications post-traductionnelles des NF</i> | 29 |
| c. <i>Fonction des NFs</i> | 29 |
| 1. <i>Fonction n°1 : Croissance axonale</i> | 29 |
| 2. <i>Fonction n°2 : Augmentation du diamètre axonal</i> | 29 |
| 3. <i>Fonction n°3 : Densité dendritique</i> | 30 |
| 4. <i>Fonction n°4 : Vitesse de transport axonal</i> | 30 |
| G. LES CELLULES IPS | 30 |
| III. OBJECTIF DU TRAVAIL | 32 |
| IV. MATERIELS ET METHODES | 34 |
| A. CELLULES IPS | 34 |
| B. CULTURE DES MOTONEURONES | 34 |
| C. CULTURE DES CELLULES S16 | 35 |
| D. CULTURE DES MYOBLASTES | 35 |
| E. CO CULTURE | 35 |
| F. FABRICATION DES PUCES EN SILICONE | 35 |
| G. IMMUNOMARQUAGES | 36 |
| H. WESTERN BLOT | 36 |
| I. ANTICORPS | 36 |
| J. TRANSCRIPTOMIQUE | 37 |

| | |
|---|-----------|
| V. RESULTATS..... | 39 |
| A. DEVELOPPEMENT DU MODELE CELLULAIRE DE MOTONEURONES..... | 39 |
| a. <i>Culture des motoneurones</i> | 39 |
| 1. Obtention de progéniteurs de motoneurones à partir de cellules iPS | 39 |
| 2. Obtention de motoneurones à partir des progéniteurs | 41 |
| 3. Contrôles qualités de la différenciation | 42 |
| b. <i>Optimisation de culture de la différenciation</i> | 44 |
| 1. Support de culture | 44 |
| 2. Elimination des cellules non différenciées..... | 45 |
| c. <i>Autres modèles en développement</i> | 46 |
| 1. Culture 3D des motoneurones..... | 47 |
| 2. Culture 3D des motoneurones en micro pattern | 48 |
| 3. Co culture | 52 |
| a) Co culture de cellules de Schwann et de motoneurones | 52 |
| b) Co- culture motoneurones et myoblastes | 53 |
| B. APPLICATION DU MODELE AVEC LE PROJET CMT2CC..... | 56 |
| a. <i>Cas clinique</i> : | 56 |
| b. <i>Données préliminaires à l'étude</i> | 57 |
| c. <i>Matériels cellulaires</i> | 57 |
| d. <i>Résultats de différenciation des cellules iPS en motoneurones</i> | 59 |
| e. <i>Recherche de phénotype</i> | 60 |
| 1. Analyse des variants par immunofluorescence | 60 |
| a) Anticorps anti NF-H muté | 60 |
| b) Marquage NF-H /lignées | 63 |
| 2. Analyse des variants par Western Blot..... | 67 |
| a) Test des anticorps CAE1 et CAE2..... | 67 |
| b) Protéine NF-H | 69 |
| 3. Analyse des variants par Transcriptomique..... | 72 |
| a) Extraction ARN | 72 |
| b) Transcriptomique..... | 75 |
| VI. DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES..... | 80 |
| A. PROTOCOLE DE BASE | 80 |
| B. CO CULTURES | 80 |
| a. <i>MN et cellules de Schwann</i> | 80 |
| b. <i>MN et myotubes</i> | 81 |
| c. <i>Jonction NeuroMusculaire</i> | 81 |
| C. PUCES EN SILICONE | 82 |
| D. MODELE DE LA CMT2CC | 82 |
| VII. REFERENCES BIBLIO..... | 85 |
| VIII. ANNEXES | 92 |

Table des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1: Représentation du système nerveux | 13 |
| Figure 2: Schéma de la neurulation avec formation du tube neural | 14 |
| Figure 3: Schéma de l'organisation du système nerveux périphérique au niveau de la moelle épinière. | 15 |
| Figure 4: Organisation du système nerveux périphérique au niveau de la moelle épinière | 16 |
| Figure 5: Organisation spatiale des MN dans la moelle épinière. | 17 |
| Figure 6: Principaux composants de l'unité motrice. | 18 |
| Figure 7: Structure des jonctions neuromusculaires des mammifères (JNM).19 | |
| Figure 8: Schéma d'un motoneurone myélinisé permettant la conduction saltatoire au niveau des nœuds de Ranvier. | 20 |
| Figure 9: Une illustration schématique de la relation développementale des cellules de Schwann (neurolemmocytes) aux axones myélinisés et non myélinisés. | 21 |
| Figure 10: Myogenèse d'une fibre musculaire : représentation schématique des différentes étapes de la différenciation myogénique..... | 22 |
| Figure 11 : Organisation du muscle squelettique ¹⁹ | 23 |
| Figure 12 : Patients atteints de la maladie de Charcot-Marie-Tooth..... | 24 |
| Figure 13: Organigramme des différentes formes de CMT | 25 |
| Figure 14: Différentes formes de la maladie de Charcot-Marie-Tooth et des gènes associés d'après Pipis 2019 ²⁸ . Diagrammes de Venn montrant les gènes associés au CMT par phénotype CMT large | 26 |
| Figure 15: Représentation des mutations du gène NEF-H causant la perte d'un codon STOP provoquant l'ajout de 40aa supplémentaires dont un élément amyloïde cryptique (CAE). | 27 |
| Figure 16: Schéma d'une cellule animale et de son cytosquelette (source J. Balzeau ³²) | 27 |
| Figure 17 : Représentation des 3 types de neurofilaments et assemblage pour former le cytosquelette d'après Laser-Azogi et al 2015 ⁷ | 28 |
| Figure 18: Structure des neurofilaments et modifications post traductionnelles. | 29 |
| Figure 19: Schéma de reprogrammation de fibroblastes en cellules iPS à partir d'un donneur pouvant se différencier en différents types cellulaires. https://www.news-medical.net/life-sciences/Genes-that-Control-Pluripotency.aspx | 31 |
| Figure 20: Schéma synthétique des différentes étapes de mon projet de recherche dans le cadre de mon diplôme de l'EPHE. | 33 |
| Figure 21: L'ajout des facteurs extrinsèques à des jours différents permet la différenciation des cellules iPS en progéniteurs de motoneurones. | 40 |
| Figure 22 : Induction des progéniteurs en motoneurones après dissociation des corps embryoïdes. | 41 |

| | |
|--|----|
| Figure 23: Immunofluorescence des cellules obtenues au jour 10 et jour 14 de différenciation. | 42 |
| Figure 24: Représentation graphique des résultats des contrôles qualités des progéniteurs et motoneurones obtenus à J10 (Olig2) et à J14 (Islet1) pour la différenciation n°2 de 4 lignées iPSc. | 43 |
| Figure 25: Culture des motoneurones avec la présence d'une population cellulaire proliférante (flèches rouges) et de regroupement des cellules en amas (flèches noires). | 44 |
| Figure 26 : Image de cellules non différenciées dans les cultures après 31 jours de différenciation grâce à l'ajout de 5FdU. | 46 |
| Figure 27: Obtention de motoneurones à partir d'un sphéroïde cultivé en 3D | 48 |
| Figure 28: Modèle de moules en silicone pour culture 3D pour l'étude de la croissance axonale et/ou coculture. | 49 |
| Figure 29: Image par microscopie optique des croissances axonales dans la puce silicone au jour 16 de différenciation..... | 50 |
| Figure 30: Croissance axonale des motoneurones dans un moule en silicone. | 51 |
| Figure 31: Image en microscopie optique de cocultures de cellules de Schwann et de motoneurones en 2D..... | 53 |
| Figure 32: Imagerie de la coculture Myoblastes/Mn à J16 de différenciation des MN avec fusion des myoblastes en myotubes..... | 54 |
| Figure 33: Résultats des marquages en immunofluorescence de coculture motoneurones et myoblastes dans les puces silicones après 9 jours de coculture. | 55 |
| Figure 34: Pedigree des deux familles..... | 56 |
| Figure 35: Imagerie en contraste de phase des cellules iPS des 8 lignées transmises par I-Stem avant différenciation. | 58 |
| Figure 36: Exemple de différenciation de 3 lignées iPS en motoneurones : PC56wt, PC166(hétérozygote) et PC56hmz. | 60 |
| Figure 37: Immunofluorescence des motoneurones de la lignée homozygote (PC56 hmz), la lignée du patient de la famille 2 (PC167htz) et la lignée contrôle (PC197wt) à 24 jours de différenciation..... | 62 |
| Figure 38: Analyse par microscopie confocale des immunomarquages des NF-H(Smi32) non phosphorylés de la différenciation n°1. | 64 |
| Figure 39: Analyse par microscopie confocal des immunomarquages des NF-H phosphorylés (Smi31) de la différenciation n°1. | 65 |
| Figure 40: Analyse par microscopie confocale des immunomarquages de la différenciation n°1 | 66 |
| Figure 41: Analyse par microscopie confocal des immunomarquages de la différenciation n°2. | 67 |
| Figure 42: Analyse par Western Blot des extraits protéiques de motoneurones après 24 jours (J24) ou 32 jours (J32) de différenciation in vitro. | 68 |
| Figure 43: Analyse par Western Blot des extraits protéiques de MNs au 24 jours (J24) et quantifications protéiques de NF-H. | 70 |

| | |
|--|----|
| Figure 44: Analyse par Western Blot des extraits protéiques de MNs et quantification protéique de α -tubuline. | 71 |
| Figure 45: Graphiques de quantifications de NF-H non phosphorylé, NF-H phosphorylée, NF-H totale et α -tubuline par rapport au TCE pour la différenciation n°2. | 72 |
| Figure 46: Contrôle des ARN sur gel agarose et par Bioanalyser..... | 75 |
| Figure 47: Comparaison des gènes dérégulés de deux analyses de transcriptomique | 76 |
| Figure 48: Diagramme de Venn montrant les résultats des analyses de transcriptomique des différentes comparaisons..... | 77 |
| Figure 49: Analyse d'enrichissement par Enrichr des 153 gènes dérégulés entre la lignée patient mutée et les lignées contrôle. | 78 |

Table des tableaux

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Tableau des anticorps primaires utilisés | 37 |
| Tableau 2: Tableau des anticorps secondaires utilisés | 37 |
| Tableau 3: Liste des composés permettant la différenciation des cellules iPS en motoneurones | 39 |
| Tableau 4: Résultats des contrôles qualités des progéniteurs et motoneurones obtenus à J10 (Olig2) et à J14 (Islet1) pour la différenciation n°2 de 4 lignées iPS. Résultats obtenus par comptage des cellules marquées OLIG2+ ou Islet1+ par rapport au cellules totales (DAPI) exprimés en pourcentage. | 43 |
| Tableau 5 : Lignées utilisées durant le projet. | 58 |
| Tableau 6: Quantités de protéines obtenues par lignée avec un dosage Bradford | 69 |
| Tableau 7: Dosage des ARN extraits des motoneurones après 24 jours de différenciation sur 9 lignées et 2 différenciations différentes (D1 et D2) sur nano drop et par Bioanalyser..... | 74 |
| Tableau 8: Gènes d'intérêts et leurs fonctions. | 79 |

Table des annexes

| | |
|--|-----|
| Annexe 1 : Représentation schématique des facteurs trophiques (cercles rouges) utilisés pour la différenciation des motoneurones dans cette étude et les voies de signalisations affectées. | 92 |
| Annexe 2 : Protocole de différenciation mis en place à l'INMG | 93 |
| Annexe 3 : Schémas de 5 moules en silicone pour culture 3D pour l'étude de la croissance axonale et/ou coculture..... | 105 |
| Annexe 4 : Article intitulé « Homozygous COQ7 mutation: a new cause of potentially treatable distal hereditary motor neuropathy » publié dans Brain par Jacquier et al en 2022..... | 106 |
| Annexe 5 : Article intitulé « Severe congenital myasthenic syndromes caused by agrin mutations affecting secretion by motoneurons » publié dans Acta pathologica par Jacquier et al en 2022 | 107 |

Liste des abréviations

Ac : Anticorps

AChR : *AcetylCholine receptor* (en français récepteur de l'acétylcholine)

AFM : Association Française contre les myopathies

AMM : autorisation de mise sur le marché

BMP : *bone morphogenetic protein*

BSA : *Bovine Serum Albumine* (en français : Sérum albumine bovine)

ChAT : Choline Acétyltransférase

CMT : Charcot Marie Tooth

CMT2CC : Charcot Marie Tooth de type 2CC

CBC : Centre de Biotechnologie Cellulaire

CRB : Centre de Ressource Biologique

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DAPT : N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butylester

dHMN : *distal hereditary motor neuropathy* (en français : Neuropathie distale motrice héréditaire)

DMEM : *Dulbecco Modified Eagle Medium*

DMSO : Dimethyl Sulfoxide

EB : Embryonic body (sphéroïde de progéniteurs)

ENMG : Électro-neuro-myo-gramme

FI : filaments intermédiaires

HCL : Hospices Civils de Lyon

HEK : *Human Embryonic Kidney* (en français : cellules rénales embryonnaires humaines)

HMSN : *Hereditary Motor and Sensory Neuropathy* (en français : Neuropathie motrice et sensitive héréditaire)

Hmz : homozygote

HS(A)N : Hereditary Sensory (Autonomic) Neuropathy (en français : neuropathie sensitive (autonome) héréditaire)

Htz : hétérozygote

INMG : Institut NeuroMyoGène

iPSC : *Induced pluripotent stem cell* (en français : Cellules souches pluripotentes induites).

LMC : Colonne Motrice Latérale
ME : Moelle épinière
MMC : Colonne Motrice Médiale
MN : motoneurone
MNB : Milieu pour motoneurones
NF : *Neurofilament*
NF-H : *Neurofilament Heavy Chain* (en français : neurofilament chaîne lourde)
NF-L : *neurofilament Light Chain* (en français : neurofilament chaîne légère)
NF-M : *Neurofilament Medium Chain* (en français : Neurofilament à chaîne moyenne)
NP : nerfs périphériques
NGS : *Next Generation Sequencing* (en français : Nouvelle génération de séquençage)
NMJ ou JNM : *neuromuscular junction* (en français : jonction neuromusculaire)
PBS : *Phosphate Buffered Saline* (en français : Tampon phosphate)
pNF-H : neurofilament chaîne lourde phosphorylé
PFA : Paraformaldéhyde
RA : Acide Rétinoïque
RIN : *RNA Integrity number*
RT : *Room Temperature* (en français : Température ambiante)
SAG : *Smoothened agonist*
SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique
SMGM : *Skeletal Muscle Growth Medium*
SNC : Système nerveux central
SNP : Système nerveux périphérique
SVF : Sérum de Veau Fœtal
TCE : Trichloroéthanol
VUS : *variant of unknown significance* (en français : variant de signification inconnu)
WB : Western Blot
Wt : Wild type (en français : forme sauvage)

I. Introduction

Le système nerveux est responsable de la coordination des actions avec l'environnement extérieur et de la communication rapide entre les différentes parties du corps. Il est composé d'une part du système nerveux central (SNC) qui est composé de l'encéphale et de la moelle épinière qui intègrent les informations afférentes et renvoient des commandes, et d'autre part du système nerveux périphérique composé principalement par les nerfs périphériques (NP), qui véhiculent les informations sensibles et motrices vers et depuis le SNC. Chez l'Homme, les NP sont en majorité mixtes, c'est-à-dire formés de fibres nerveuses (axones) sensibles et motrices. Ces axones sont, pour la plupart, entourés par une gaine de myéline protectrice et nourricière. Celle-ci est formée par l'enroulement de cellules gliales autour des axones : les cellules de Schwann.

La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) est une neuropathie périphérique rare qui englobe plusieurs sous-types selon que l'atteinte est sensible, motrice ou mixte. Des mutations dans plus de 80 gènes ont été identifiées comme pouvant être la cause de cette pathologie (Benquey et al 2022¹). Néanmoins, l'efficacité du rendu de diagnostic moléculaire reste faible (environ 25% pour les formes motrices de CMT en 2019²). Les progrès de la génétique et le recours au séquençage haut débit (NGS) ont permis de grandes avancées dans le diagnostic des patients, mais elles génèrent souvent des variants de signification inconnue (*variant of unknown significance*, VUS). Afin de réduire l'errance diagnostique, il est nécessaire de développer des tests fonctionnels *in vitro* et *in vivo* pour déterminer s'ils sont pathogènes.

La CMT2CC est une forme de CMT caractérisée par une neuropathie axonale sévère, à prédominance motrice due à des mutations du gène codant pour la chaîne lourde des neurofilaments (*Neurofilament Heavy Chain*, NF-H) (Rebelo et al 2016³; Jacquier et al 2017⁴). Actuellement, seules 8 familles ont été découvertes dans le monde avec des mutations du gène NF-H (pipis et al. 2022⁵). Sept ans après la découverte de ces premiers variants pathogènes, la physiologie de cette maladie n'est pas encore comprise et le développement de différents modèles *in vitro* et *in vivo* est capital pour sa compréhension et constitue un premier jalon dans la recherche d'un traitement pharmacologique. Parmi ces modèles, le recours à la reprogrammation de cellules de patient en cellules souches pluripotentes induites (iPSc) est une opportunité unique d'étudier la physiopathologie d'une maladie dans le type cellulaire affecté chez les patients, d'évaluer l'efficacité de traitement pharmacologique ou de cribler une chimiothèque de molécules repositionnables (médicaments possédant déjà une autorisation de mise sur le marché (AMM)).

En 2017, Jacquier et collaborateurs⁴ ont décrit deux patients Français possédant chacun des variants différents du gène NF-H mais qui avaient tous deux pour conséquence la délétion de deux nucléotides dans le dernier exon du gène, causant un décalage du cadre de lecture, la suppression du codon stop naturel et la traduction de 40 acides aminés supplémentaires dans le 3'UTR jusqu'à l'arrivée d'un nouveau codon stop. L'équipe a montré que la surexpression des protéines mutées induit la formation d'agrégats dont l'accumulation devient progressivement toxique (Jacquier et al, 2017). La suite logique de cette étude est d'investiguer si l'accumulation

d'agrégats protéiques observés avec la surexpression des mutants de NF-H est aussi présente dans les motoneurones dérivés des patients et cultivés *in vitro*. L'observation d'un tel phénotype permettrait de développer un test cellulaire utilisable dans le criblage d'une chimiothèque.

L'objectif de mon projet de diplôme d'EPHE a donc été d'établir le modèle de différenciation des cellules iPS humaines en motoneurones. Le développement de cette technique au sein du laboratoire a permis de différencier les cellules iPS des deux patients décrits dans la publication de Jacquier et al.⁴ dans le but d'identifier un phénotype cellulaire. La différenciation des cellules iPS en motoneurones que j'ai mise en place dans le laboratoire est maintenant utilisée pour de nombreux projets de recherche modélisant des maladies du motoneurone, qu'elles soient héritées ou acquises.

Enfin, depuis les travaux des laboratoires de Don Cleveland (Boillée et al 2006⁶) et de Prezborski (Nagai et al 2007⁷), on sait que l'environnement cellulaire du motoneurone, et notamment sa connexion avec les cellules de Schwann et les cellules musculaires, joue un rôle capital dans le déclenchement et la progression des maladies du motoneurone telles que la sclérose latérale amyotrophique ou maladie de Charcot. J'ai donc développé des systèmes de co-culture entre des motoneurones humains, des myoblastes humains ou des lignées de cellules de Schwann afin de produire un système *in vitro* le plus physiologique possible.

II. Rappels bibliographiques

A. Le système nerveux périphérique

Le système nerveux est composé du système nerveux central (SNC) comprenant le cerveau et la moelle épinière, et le système nerveux périphérique (SNP) formé des ganglions et des nerfs (fig 1). La fonction principale du SNP est de transmettre l'information entre les organes et le SNC.

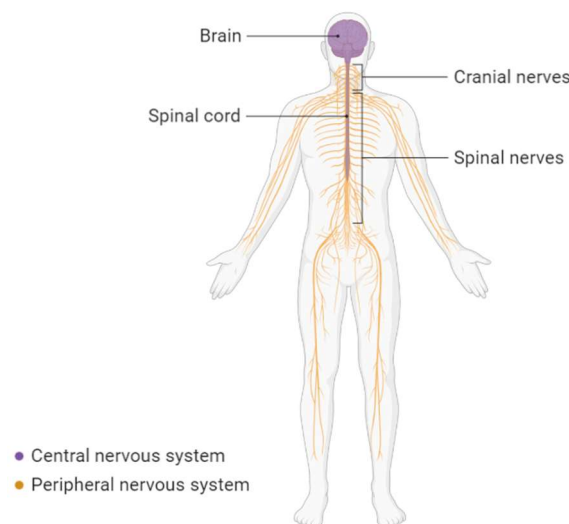


Figure 1: Représentation du système nerveux

Avec le système nerveux central (SNC) en violet et le système nerveux périphérique en orange. <https://app.biorender.com/illustrations/64363b3c4e6826d93e651b90>

a. Développement embryonnaire

Le développement du système nerveux s'effectue très tôt dans l'embryogénèse à partir des cellules de la crête neurale juste après la gastrulation (apparition de l'ectoderme). Il se développe durant la neurulation. La notochorde est formée lors de la gastrulation et induit la formation de la plaque neurale à partir de l'ectoderme lors de la deuxième semaine de gestation (fig 2). Les cellules de la notochorde émettent des signaux inducteurs conduisant les cellules de l'ectoderme à se différencier en cellules précurseurs du tissu nerveux⁸. Les cellules progénitrices du tube neural sont des cellules souches neurales. Elles sont capables de se différencier en neurones, astrocytes ou oligodendrocytes. Ces cellules souches deviennent des neuroblastes qui se différencient en neurones⁹.

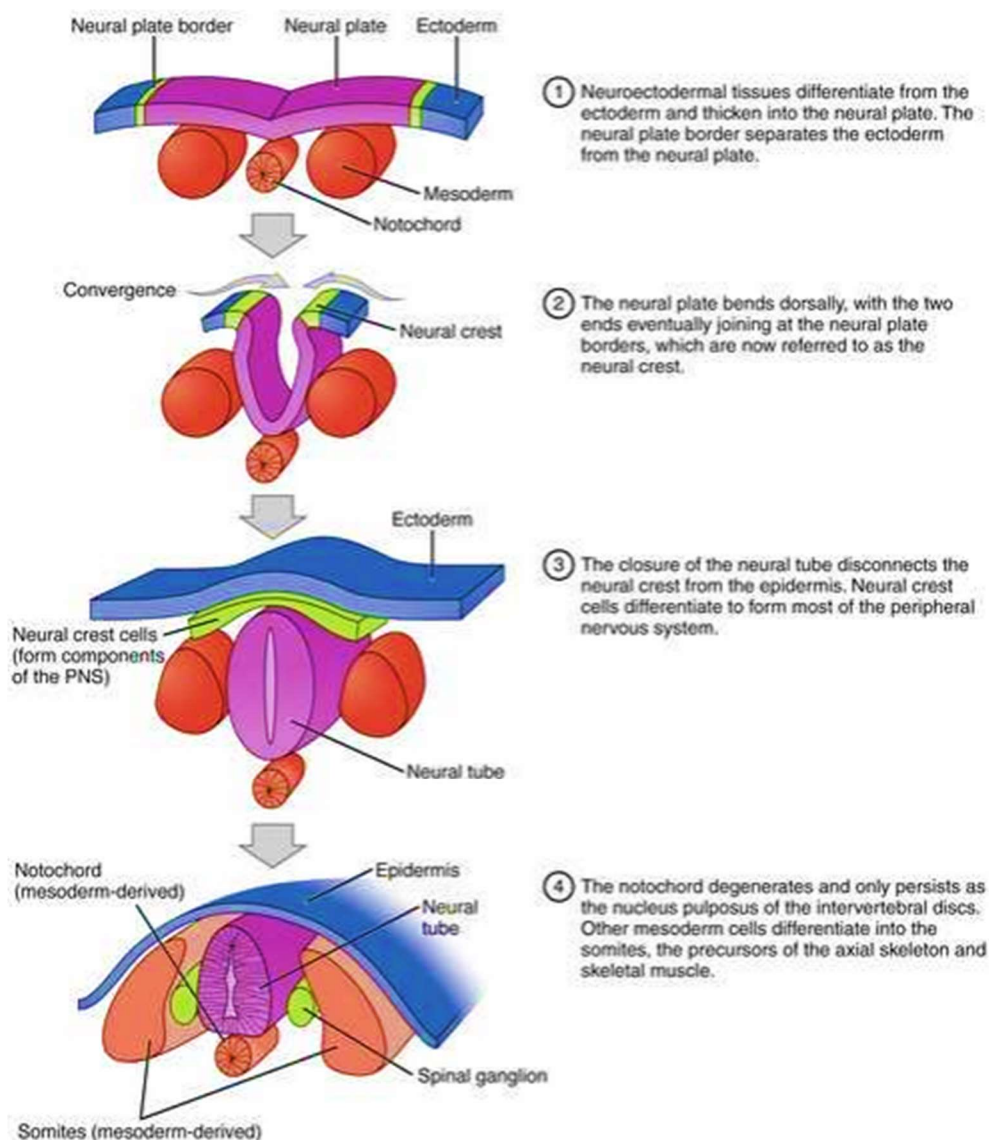


Figure 2: Schéma de la neurulation avec formation du tube neural
OpenStax College, CC BY 3.0, via Wikimedia Commons

b. Organisation du système nerveux périphérique

Le système nerveux périphérique (SNP) est principalement formé des nerfs issus de la moelle épinière et de l'encéphale. Il est composé de nerfs spinaux qui transmettent les influx nerveux entre certaines parties du corps et la moelle épinière (et inversement) et de nerfs crâniens qui acheminent l'influx à l'encéphale (et inversement) (Livre Biologie Humaine, Edition PEARSON chap.7 p222).

Au niveau fonctionnel, le SNP comprend 2 subdivisions : i) la voie sensitive qui est la voie afférente qui véhicule vers le SNC les influx venant des récepteurs sensoriels disséminés dans l'organisme et ii), la voie motrice, dite efférente, qui transmet, à partir du SNC, l'influx aux organes effecteurs tels que les muscles pour déclencher une réponse motrice.

Le SNP comprend dix des douze nerfs crâniens (les deux autres étant partie du SNC) et les 31 paires de nerfs spinaux (8 cervicaux, 12 thoraciques, 5 lombaires, 5 sacrés et 1 au niveau du coccyx) qui prennent leur origine au niveau de la moelle épinière (fig 3).

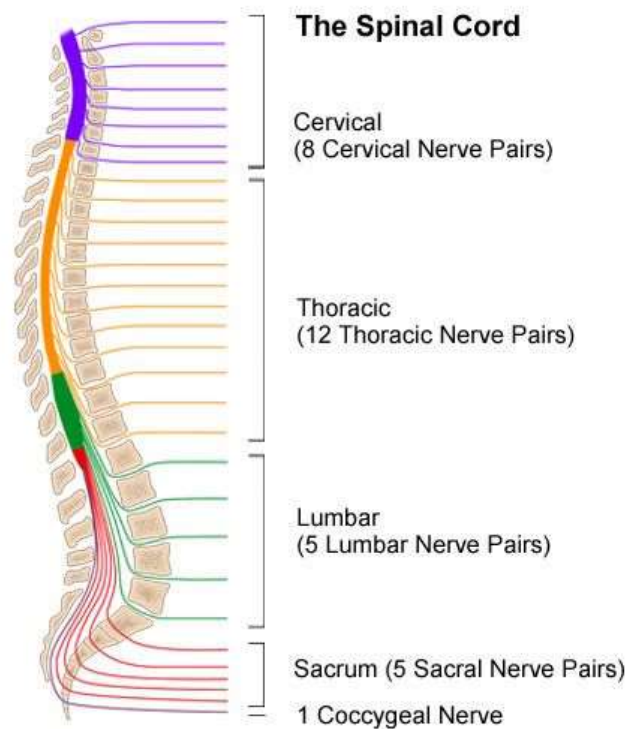


Figure 3: Schéma de l'organisation du système nerveux périphérique au niveau de la moelle épinière.

<https://www.spectrumhealthlakeland.org/lakeland-neurosurgery/neurosurgery-health-library/Content/134/89>

c. Rôle du système nerveux périphérique

Le SNP a trois fonctions de base. La première est de transmettre des commandes motrices à tous les muscles striés volontaires du corps. La seconde est de transmettre des informations sensorielles de l'extérieur et du corps vers le cerveau et la moelle épinière¹⁰. Enfin, la troisième contrôle la régulation des fonctions autonomes telles que la pression artérielle ou la transpiration.

d. Composition cellulaire du SNP

Les principales cellules qui composent le SNP sont les neurones sensoriels, les neurones moteurs ou motoneurones (MNs), les cellules de Schwann (neurolemmocytes) et les cellules satellites (gliocytes ganglionnaires)¹¹.

Les neurones sensoriels reçoivent des informations sur ce qui se passe à l'intérieur et à l'extérieur du corps et les transmettent au SNC qui les analyse. Les corps cellulaires de neurones sensitifs se situent dans les ganglions des racines dorsales et transmettent l'information aux neurones situés dans la matière grise de la moelle épinière. Les neurones moteurs reçoivent des informations d'autres neurones (notamment des neurones sensitifs par l'intermédiaire des neurones d'associations) et transmettent des influx aux muscles, aux organes et aux glandes. Les corps cellulaires des neurones se situent dans la corne ventrale de la substance grise de la moelle épinière (fig 4). La description des motoneurones sera détaillée dans la sous-partie suivante.

Les cellules de Schwann se placent le long des axones des neurones sensitifs et moteurs. Elles produisent de la myéline, la substance isolante qui forme une gaine autour des axones. En induisant une propagation saltatoire entre les nœuds de Ranvier formés à l'interface entre deux cellules de Schwann, la gaine de myéline permet d'augmenter considérablement la vitesse de progression des potentiels d'action le long des axones. Elle joue également un rôle crucial dans la protection des axones.

Les cellules satellites gliales sont quant à elles non myélinisantes et se situent au niveau des corps cellulaires des neurones au sein des ganglions. Il semblerait qu'elles aient une fonction de soutien des neurones et servent de barrière protectrice¹¹.

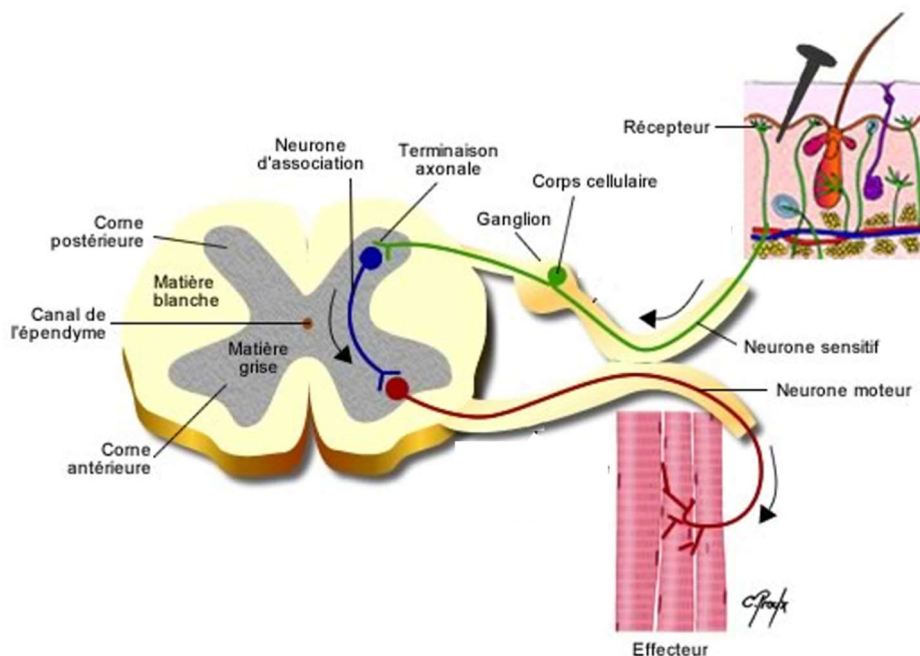


Figure 4: Organisation du système nerveux périphérique au niveau de la moelle épinière
http://www.democritique.org/Cerveau/Spinal_Chord_Area_Class.svg.xhtml

A. Les motoneurones

Les motoneurones (MNs) sont des cellules qui permettent le transfert de l'information du système nerveux central jusqu'aux fibres musculaires (fig 5). Chaque motoneurone forme, avec les fibres musculaires qu'il innerve, une unité motrice.

Parmi les MNs spinaux, on distingue les MNs viscéraux qui innervent les ganglions du système sympathique et les MNs somatiques innervant les muscles squelettiques. Les MNs somatiques se localisent dans la partie ventrale de la moelle épinière (fig 5B) selon une organisation spatiale très précise. Des signaux inducteurs et inhibiteurs vont spécifier les MNs en fonction de la concentration et de la durée d'exposition à des facteurs induisant des expressions géniques différentes. Ainsi, on retrouve le long de l'axe rostro-caudal une organisation spécifique des MNs cervicaux, brachiaux ou thoraciques et lombaires qui innervent les muscles du tronc et des membres (fig 5)¹². Les corps cellulaires des MNs sont également organisés en colonnes dans le sens medio-latéral de la moelle épinière (fig 5). La Colonne Motrice Médiane (MMC) est toujours située au centre de la moelle dans l'axe medio-latéral et s'étend sans discontinuer le long de la moelle épinière. La MMC est responsable de l'innervation des muscles proximaux du tronc. La Colonne Motrice Latérale (LMC) n'est retrouvée qu'au niveau brachial et lombaire et en position latérale de la MMC dans l'axe médio-latéral. La LMC innerve les muscles des membres.

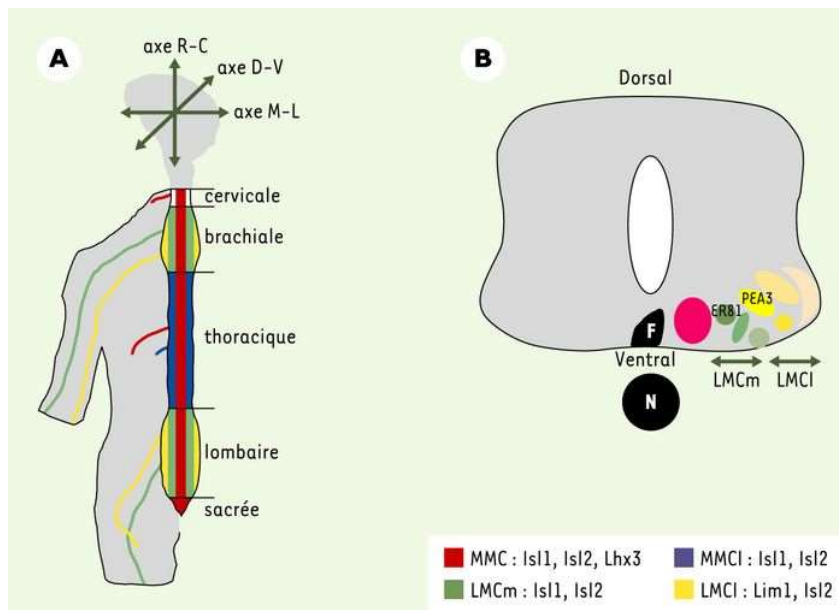


Figure 5: Organisation spatiale des MN dans la moelle épinière.

A) Les MN sont organisés en colonnes motrices. Les trois axes de positionnement sont indiqués : rostro-caudal (R-C), dorso-ventral (D-V), médio-latéral (M-L). L'ensemble du système nerveux central est représenté : le cerveau qui possède des MN (non schématisés) est en grisé ; la Moelle épinières est subdivisée en cinq régions, cervicale, brachiale, thoracique, lombaire et sacrée. Différentes projections somatotopiques des axones des MNs vers la périphérie sont représentées sur la partie gauche, chaque nerf ayant la couleur de la colonne à laquelle il appartient. B) Schéma d'une coupe transversale au niveau lombaire de la ME à ce niveau, il n'y a pas de colonne motrice médiane (MMC). Chaque colonne motrice est composée de plusieurs groupes, chaque groupe innervant un muscle donné. LMC : colonne motrice latérale, F: floor plate, N: notochorde (d'après Chauvet et al12)

a. Caractéristiques morphologiques

Les motoneurones sont composés d'un corps cellulaire (appelé soma) contenant le noyau et les organites habituels : réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, mitochondrie ...). Les corps cellulaires sont regroupés dans la corne ventrale de la moelle épinière. C'est le centre métabolique du neurone. La plupart des protéines neuronales sont synthétisées dans le soma.

Les motoneurones possèdent de nombreux prolongements courts qui s'étendent à partir du corps cellulaire appelés dendrites et une extension longue appelée axone. A l'extrémité de l'axone se trouve le cône de croissance où va se former la connexion avec la cellule musculaire, appelée synapse neuro musculaire ou jonction neuromusculaire (fig 6).

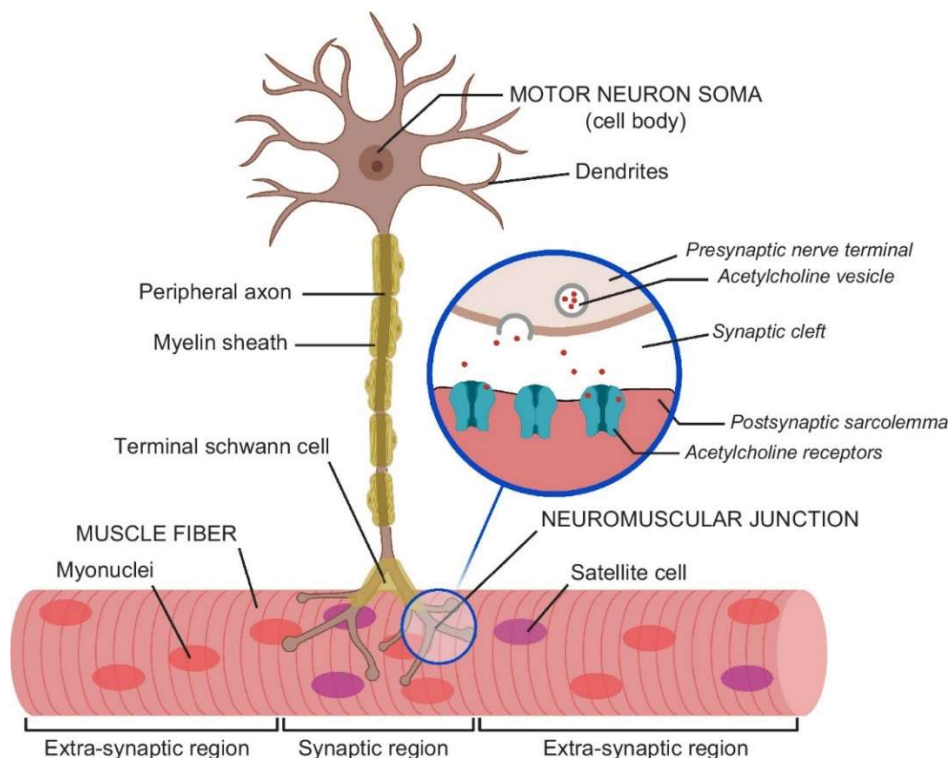


Figure 6: Principaux composants de l'unité motrice.

Le soma (corps cellulaire) d'un motoneurone, situé dans la moelle épinière, et les fibres musculaires qu'il innerve par l'intermédiaire des jonctions neuromusculaires constituent une unité fonctionnelle appelée unité motrice. Les axones, enveloppés dans des gaines de myéline, permettent la propagation instantanée du potentiel d'action. La jonction neuromusculaire est composée du terminal présynaptique du côté du nerf et de la membrane postsynaptique du côté du muscle, séparés par une fente synaptique (source Soendenbroe et al ¹³).

b. Les dendrites

Les dendrites sont les récepteurs des signaux entrants des motoneurones. Lorsqu'un motoneurone reçoit un signal au niveau dendritique provenant d'autres neurones, un potentiel d'action (ou impulsion nerveuse) va être déclenché et se propager le long de l'axone jusqu'aux synapses. Les dendrites jouent un rôle majeur dans le traitement de l'information. Le nombre, la morphologie et la localisation des dendrites sont

différents en fonction des familles de neurones et sont associés à des propriétés électriques¹⁴.

Les dendrites possèdent de courtes excroissances appelées épines dendritiques (de 1 à 2 microns). Ces épines contiennent les membranes et les polysomes nécessaires à la biosynthèse locale de protéines.

c. L'axone

L'axone est un prolongement pouvant atteindre plus d'un mètre de long et qui conserve un diamètre presque identique sur toute sa longueur. L'axone émerge du corps cellulaire au niveau d'une zone spécialisée appelée le collet de l'axone.

Au niveau de son extrémité, l'axone se divise en plusieurs branches et développe des gonflements bulbeux appelés terminaisons axonales (ou terminaisons nerveuses). Ces terminaisons axonales établissent des connexions avec les fibres musculaires¹⁴. De plus, les axones sont recouverts par une gaine de myéline, permettant de les protéger et d'accélérer la transmission nerveuse. Cette gaine de myéline est générée par les cellules de Schwann dans le SNP et par les oligodendrocytes dans le SNC.

d. Les synapses

Les connexions synaptiques entre les motoneurones et les cellules musculaires squelettiques sont généralement appelées les jonctions neuromusculaires (fig 7). Au niveau de ces synapses, l'information est transmise sous la forme de messagers chimiques appelés neurotransmetteurs. Le neurotransmetteur sécrété par les motoneurones est l'acétylcholine. Lorsqu'un potentiel d'action se déplace le long d'un axone et atteint la terminaison axonale, cela déclenche la libération de ce neurotransmetteur dans la fente synaptique et se lie aux récepteurs membranaires sur la cellule musculaire postsynaptique, transmettant ainsi un signal excitateur.

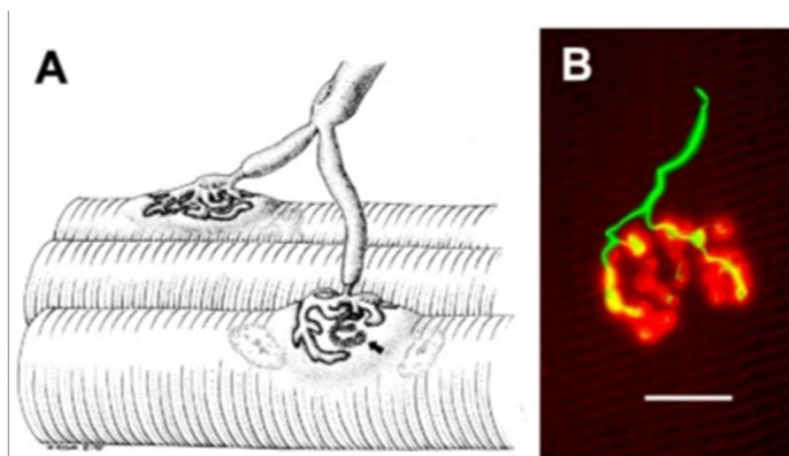


Figure 7: Structure des jonctions neuromusculaires des mammifères (JNM).

(A) Schéma montrant un axone moteur qui se ramifie pour innover deux fibres musculaires au niveau des NMJ. (B) JNM humaine montrant la terminaison nerveuse (vert, immunomarquage de la synaptophysin et de la protéine neurofilamentaire) et les récepteurs postsynaptiques de l'acétylcholine (AChR) (rouge, marqué par fluorescence α -bungarotoxine). Barre d'échelle, 20 μ m; (source Slater et al¹⁵).

B. Les cellules de Schwann

Les cellules de Schwann (ou neurolemmocytes) appartiennent aux cellules gliales qui assurent principalement l'isolation myélinique des axones du SNP⁸. Elles assurent la myélinisation des axones permettant la conduction saltatoire du potentiel d'action (c'est-à-dire par saut d'un nœud de Ranvier à l'autre) lui conférant une grande vitesse (fig 8).

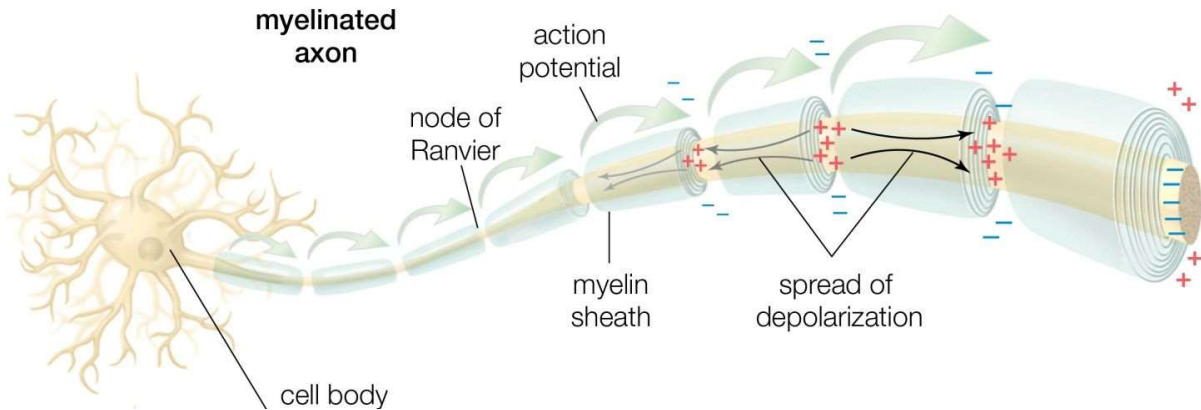


Figure 8: Schéma d'un motoneurone myélinisé permettant la conduction saltatoire au niveau des nœuds de Ranvier.

<https://galvinconanstuart.blogspot.com/2016/11/nerve-cell-diagram.html>

a. Développement des cellules de Schwann

Les cellules de Schwann dérivent de la crête neurale, qui se forme au-dessus du tube neural au cours du développement embryonnaire⁸. Les précurseurs issus des crêtes neurales se différencient en cellules de Schwann immatures qui entourent des dizaines d'axones à la fois. Des signaux extrinsèques provenant de l'axone et de la matrice extracellulaire induisent la différenciation terminale en cellules de Schwann myélinisantes qui entourent un seul axone, ou en cellules de Schwann non-myélinisantes qui entourent plusieurs axones de faible diamètre¹⁶.

Le diamètre axonal semble jouer un rôle central : les axones les plus larges induisent la différenciation en cellules de Schwann myélinisantes par le biais d'un signal moléculaire (notamment par la sécrétion de neureguline). Les axones plus fins n'émettent pas suffisamment de signal pour induire cette différenciation⁸ (fig 9).

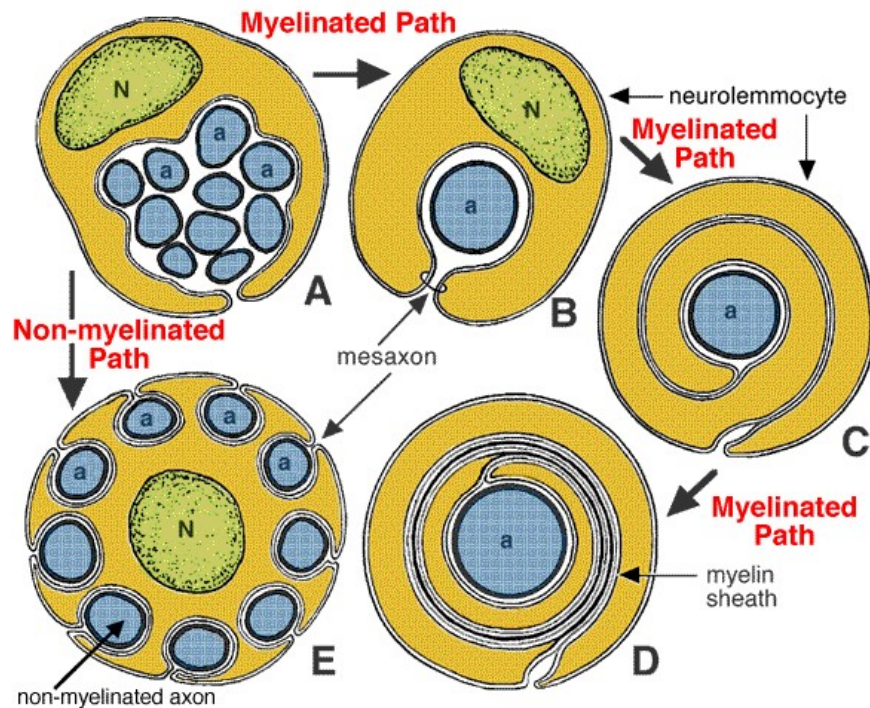


Figure 9: Une illustration schématique de la relation développementale des cellules de Schwann (neurolemmocytes) aux axones myélinisés et non myélinisés.

Initialement, chaque neurolemmocyte entoure plusieurs axones (en haut à gauche). Si les axones sont destinés à rester petits et non myélinisés, le neurolemmocyte enveloppe de nombreux axones individuellement (en bas à gauche). Si les axones sont destinés à devenir gros et myélinisés, alors les neurolemmocytes prolifèrent, développent une relation un-à-un avec chaque axone, produisent des couches de myéline autour de l'axone pour produire un entre-nœud de gaine de myéline pour chaque mm ou moins de longueur le long de l'axone. <http://vanat.cvm.umn.edu/neurHistAtls/pages/glia17.html>

b. Fonction des cellules de Schwann

Les cellules de Schwann jouent un rôle très important dans l'isolation des axones des nerfs périphériques. Elles permettent d'augmenter la vitesse de propagation de l'influx nerveux en générant une conduction saltatoire (fig 8). La gaine de myéline fabriquée par les cellules de Schwann étant isolante, les canaux sodiques voltage-dépendants (responsables de la dépolarisation de la membrane de l'axone et de la conduction du potentiel d'action) ne se trouvent qu'au niveau des nœuds de Ranvier qui correspondent aux parties de l'axone non recouvertes de myéline (fig 8). En sautant d'un nœud de Ranvier à l'autre, la propagation de la dépolarisation et donc de l'influx nerveux est rendue plus rapide^{17,18}. Les cellules non myélinisantes ont également un rôle important : elles sont cruciales pour la survie des neurones et protègent l'axone de la dégradation par des agents pathogènes ou des produits toxiques.

C. Le muscle squelettique strié

Les cellules des muscles striés squelettiques proviennent du mésoderme, elles n'appartiennent pas au SNP mais elles sont la cible des axones des neurones de la moelle épinière. Les jonctions neuromusculaires se forment vers la dixième semaine de la vie embryonnaire¹⁹.

Les cellules musculaires passent par plusieurs stades de différenciation. Les myoblastes issus des somites fusionnent pour former des myotubes multinucléés qui mûrissent ensuite en fibres musculaires matures. Ces fibres sont donc polynucléées et chaque noyau contrôle la synthèse des protéines au sein d'une région spécifique de la fibre musculaire²⁰ (fig 10).

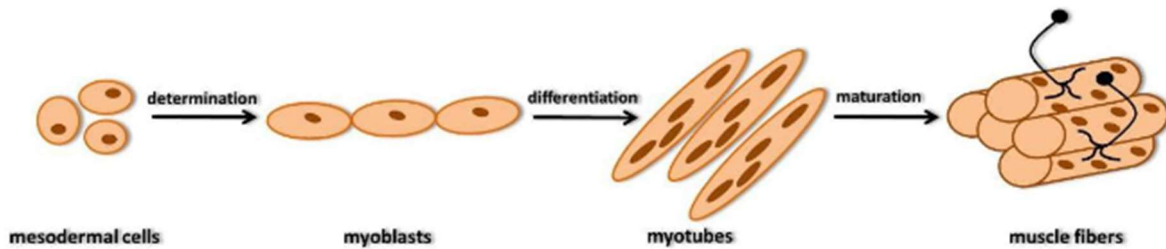


Figure 10: Myogénèse d'une fibre musculaire : représentation schématique des différentes étapes de la différenciation myogénique.

La détermination donne aux cellules mésodermiques la compétence pour se différencier en myoblastes, cellules fusiformes avec un seul noyau ; la différenciation comprend le processus de fusion des myoblastes pour former un myotube présentant initialement des noyaux centraux ; la maturation est le processus au cours duquel des bandes transversales et des sarcomères apparaissent et deviennent excitables et capables de se développer en fibres musculaires. Les noyaux migrent à la périphérie. La lame basale entoure la fibre et accueille les cellules satellites. Une accumulation de noyaux est visible sous la jonction neuromusculaire (JNM) Image issu de TROVATO et al 2016²¹

Le muscle squelettique est constitué de faisceaux musculaires formés eux-mêmes d'un ensemble de fibres musculaires et de tissu conjonctif. Chaque muscle est inséré sur l'os par l'intermédiaire de tendons constitués essentiellement de tissu fibreux, élastique et solide (fig 11). Les muscles squelettiques contiennent 3 couches de tissu conjonctif : l'endomysium qui entoure chaque fibre musculaire, le périmysium qui rassemble différentes fibres musculaires en faisceau de fibres musculaires et l'épimysium qui recouvre l'ensemble du muscle.

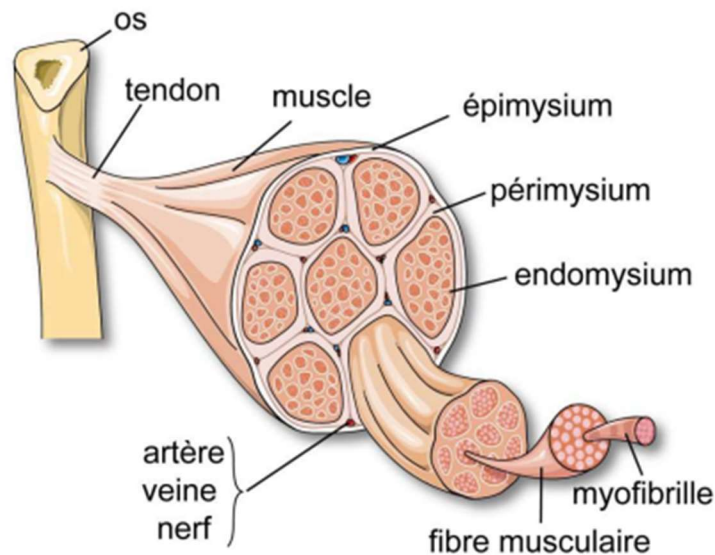


Figure 11 : Organisation du muscle squelettique¹⁹.

D. La maladie de Charcot-Marie-Tooth

a. Clinique/Epidémiologie

La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) est une pathologie génétique rare qui se déclare dès l'enfance ou à l'âge adulte et concerne 1 personne sur 2 500^{22,23}, soit environ 30 000 personnes en France.

Cliniquement, elle se manifeste par une force musculaire diminuée et une amyotrophie (fonte des muscles) au niveau des extrémités et des jambes (pieds et mollets) et parfois plus tardivement, des mains voire des avant-bras. On parle de distribution longueur-dépendante des symptômes. Il s'y associe des troubles de la sensibilité (au toucher, à la chaleur, au froid...) dans les mêmes territoires, mais qui sont généralement au second plan. Des déformations ostéoarticulaires peuvent également être présentes, comme des pieds creux (fig 12) ou plats, une scoliose etc²⁴. Enfin, les réflexes ostéo-tendineux sont abolis.

La CMT est la neuropathie héréditaire la plus fréquente. D'un point de vue physiopathologique, elle peut être causée soit par la dégénérescence des axones des neurones moteurs et sensoriels, soit par la dégénérescence des cellules de Schwann qui constituent la gaine de myéline du nerf périphérique, une enveloppe de l'axone primordiale pour la conduction nerveuse.

Les nerfs périphériques sont impliqués dans la remontée des informations des organes sensoriels cutanés et musculaires jusqu'à la moelle épinière, *via* les neurones sensitifs, ainsi que dans le contrôle des muscles par les voies efférentes motrices représentées par les neurones moteurs.

A ce jour, plus de 80 gènes ayant des fonctions importantes dans les neurones ou les cellules de Schwann ont été identifiés pour leur implication dans l'apparition et la transmission du CMT²⁵ (Centre Neuromusculaire de l'université de Washington, St. Louis, USA ; <http://neuromuscular.wustl.edu>).

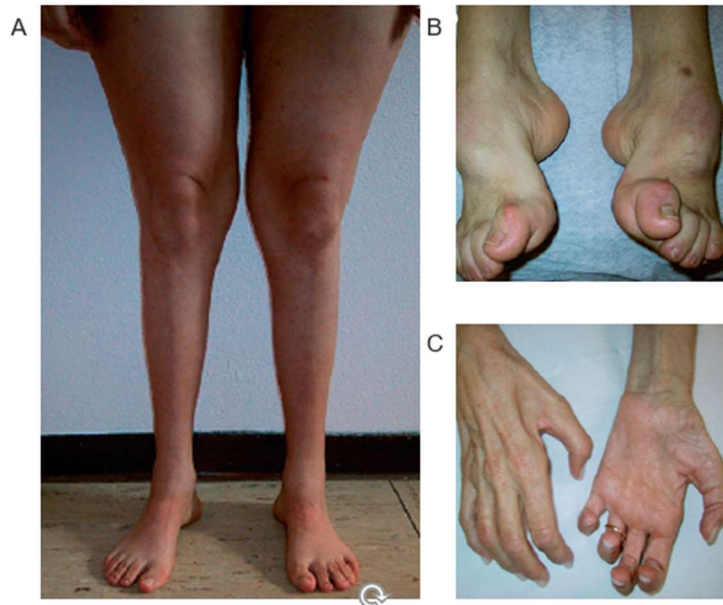


Figure 12 ; Patients atteints de la maladie de Charcot-Marie-Tooth.

A) Fonte musculaire des jambes et du tiers inférieur de la cuisse. B) Déformations du pied (C) Atrophie sévère des muscles intrinsèques de la main (main en griffe) (source Pareyson et al, 2009²⁴).

b. Diagnostic

Le diagnostic est évoqué cliniquement par la mise en évidence d'un déficit moteur et parfois sensitif possédant les caractéristiques décrites ci-dessus, longueur dépendant, évocateur d'une atteinte du système nerveux périphérique car associé à une aréflexie. L'examen électrophysiologique des nerfs (électro-neuro-myo-gramme, ou ENMG) permet de confirmer l'atteinte des nerfs moteurs et sensitifs, et de préciser le type d'atteinte²⁶. La mesure de la vitesse de conduction nerveuse permet de distinguer une atteinte de la myéline (formes démyélinisantes) d'une atteinte primaire du neurone (formes axonales).

Dans les formes démyélinisantes, l'électromyogramme révèle une vitesse de conduction nerveuse diminuée.

Dans les formes axonales, l'électromyogramme révèle une vitesse de conduction nerveuse normale, tandis que l'amplitude des potentiels de nerfs obtenus est diminuée.

L'analyse génétique joue un rôle central dans le processus diagnostique des CMT. Une recherche de duplication du gène *PMP22* est réalisée en première intention dans les formes démyélinisantes, puisque cette anomalie génétique est de loin la plus fréquemment en cause dans ces formes (39.5% des CMT en 2016²³ et 60 à 70% des patients CMT1²⁷). A ce jour, 33% des patients possèdent un variant dans un gène connu dans les CMT mais dont la signification pathologique n'est pas certaine et 37% des patients n'ont pas de variant identifié². Dans les formes axonales, ou dans les formes démyélinisantes sans duplication *PMP22*, une analyse génétique par séquençage de gènes est réalisée grâce au NGS, permettant la recherche de mutations dans les gènes les plus communément associés à la CMT. On parle de panel de gènes. Malheureusement, les panels de gènes actuels ne permettent d'identifier une mutation causale que chez 70% des patients pour lesquels il est réalisé².

c. Classification des CMT

Les CMT sont classées selon 3 types de critères^{28,29} (fig 13) :

1/ le type cellulaire atteint (neurone ou cellule de Schwann) dans le nerf périphérique, déterminé d'après les vitesses de conduction nerveuse à l'électroneuromyogramme :

- forme axonale (vitesse de conduction nerveuse normale > 40 m/s),
- forme démyélinisante (vitesse de conduction nerveuse < 35 m/s dans le nerf médian),
- forme intermédiaire (vitesse de conduction nerveuse entre 25 m/s et 45 m/s)

2/ Le mode de transmission génétique : autosomique dominant, autosomique récessif ou lié à l'X

Avec ces deux premiers critères, on catégorise déjà la maladie (fig 13) :

- CMT1 : démyélinisante, autosomique dominante
- CMT2 : axonale, autosomique dominante
- AR-CMT2 : axonale, autosomique récessive
- CMTX : axonale ou démyélinisante, liée à l'X
- CMT4 : démyélinisante, autosomique récessive

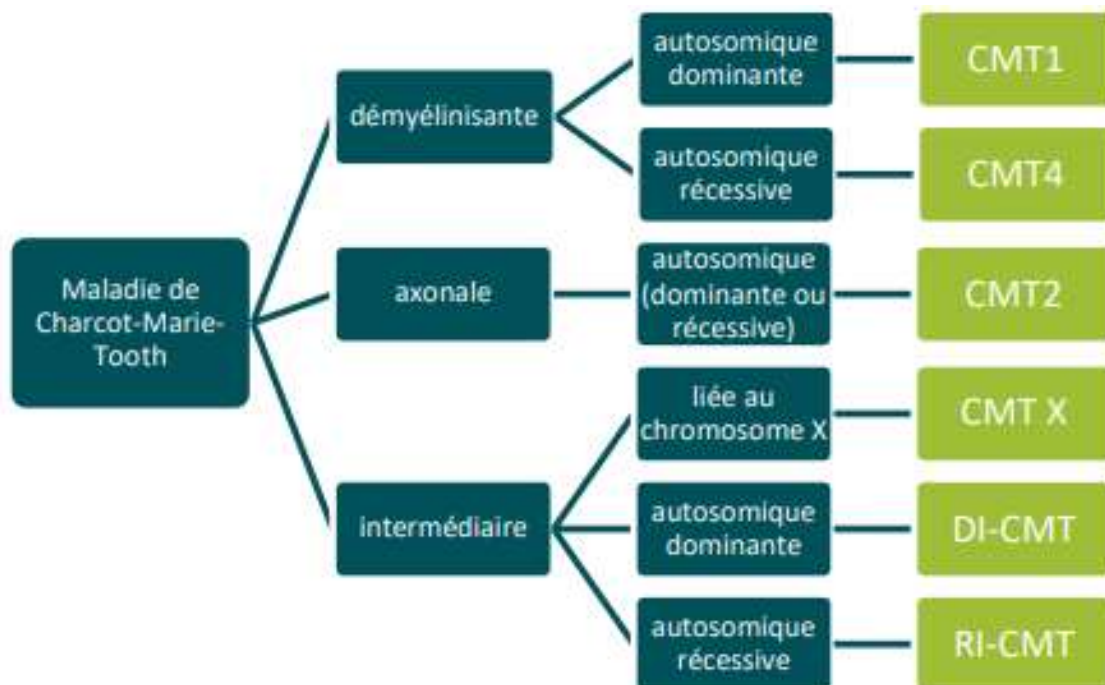


Figure 13: Organigramme des différentes formes de CMT
AFM-Téléthon | Juin 2022

3/ Enfin, le gène portant la mutation mise en cause est identifié par une lettre ajoutée à la fin de la catégorie. Par exemple, la duplication du gène *PMP22* en cause dans la majorité des CMT1 est identifiée par la lettre A. Le CMT1A correspond ainsi à la forme démyélinisante de transmission autosomique dominante secondaire à une duplication du gène *PMP22*.

Par définition, les CMT (parfois nommés *Hereditary Motor and Sensory Neuropathy*, HMSN) touchent les nerfs moteurs et sensitifs. Cependant, il existe des neuropathies

héréditaires, très proches du CMT, qui touchent soit les nerfs moteurs, soit seulement les nerfs sensitifs, avec parfois des gènes qui recouvrent différents phénotypes (fig 14). Lorsque seuls les neurones moteurs sont atteints, on parle de « dHMN » pour « distal hereditary motor neuropathy » (=amyotrophie spinale distale = CMT spinal). Dans ce cas, le déficit est uniquement moteur, et les nerfs sensitifs apparaissent normaux à l'ENMG. Lorsque seuls les neurones sensitifs sont atteints, on parle de « HS(A)N » pour « hereditary sensory (autonomic) neuropathy ». Dans ce cas, l'atteinte clinique et électrophysiologique est purement sensitive.

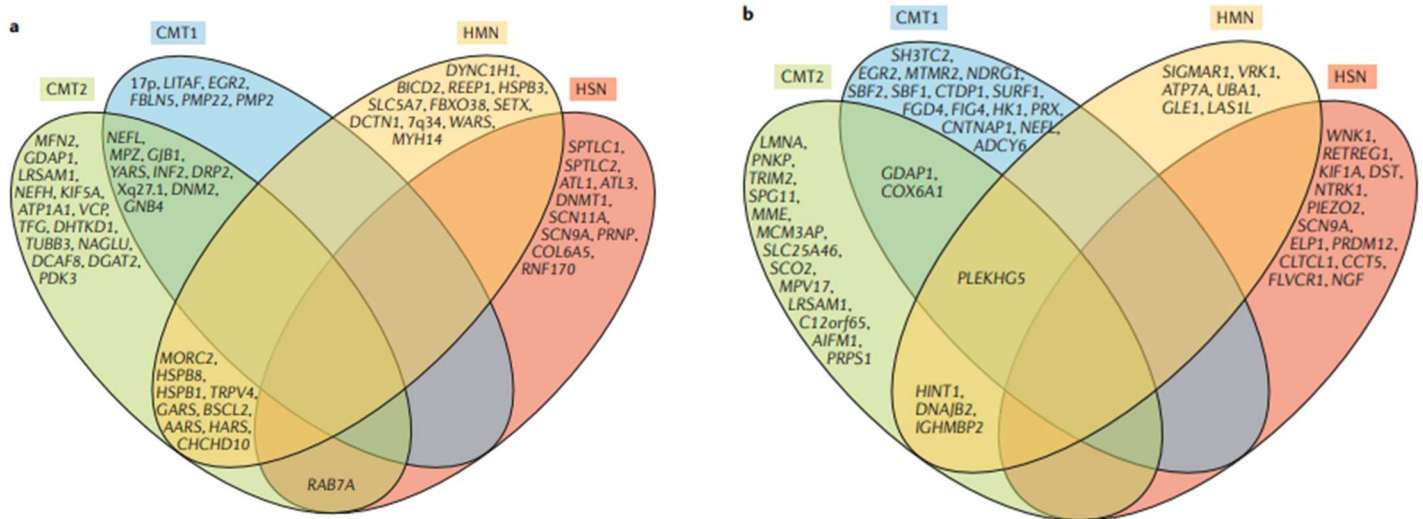


Figure 14: Différentes formes de la maladie de Charcot-Marie-Tooth et des gènes associés d'après Pipis 2019²⁸. Diagrammes de Venn montrant les gènes associés au CMT par phénotype CMT large

a) Gènes dominants autosomiques et liés à l'X. b) Gènes récessifs autosomiques et liés à l'X. Les phénotypes de la maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) sont représentés dans les cases colorées et les gènes associés à chaque phénotype sont contenus dans les ovales de la couleur correspondante. Les gènes qui ont été liés à plus d'un phénotype sont indiqués dans les zones de chevauchement des phénotypes.

E. Cas de CMT2cc

Récemment, des mutations du gène NF-H (fig 15) ont été identifiées comme une cause de CMT autosomique dominante (type 2cc)^{3,4,30,31}. La CMT2cc est une forme de maladie extrêmement rare avec seulement huit familles rapportées à ce jour^{4,5}. Le phénotype clinique et électrophysiologique de ces familles est caractérisé par une neuropathie axonale sévère, à prédominance motrice, avec des difficultés de marche importantes au début de l'âge adulte. Toutes ces mutations au sein de gène NF-H provoquent un décalage du cadre de lecture à la fin de la séquence codante, entraînant la perte du codon stop et la traduction de 40 acides aminés supplémentaires (fig 15). Ces 40 acides aminés supplémentaires codent pour un feuillet beta qualifié d'élément amyloïdogène cryptique (CAE) en raison de sa capacité à provoquer l'agrégation des protéines lorsqu'elles sont surexprimées dans les motoneurones *in vivo* et *in vitro*^{3,4}. La séquence CAE de 8-12 acides aminés a la propriété de former

un feuillet β qui s'homodimérise fortement avec lui-même, conduisant à la formation des agrégats protéiques. Ce feuillet β a été prédit par des logiciels bio-informatiques et caractérisé par surexpression dans des lignées de cellules en culture par Rebelo *et al* 2016³.

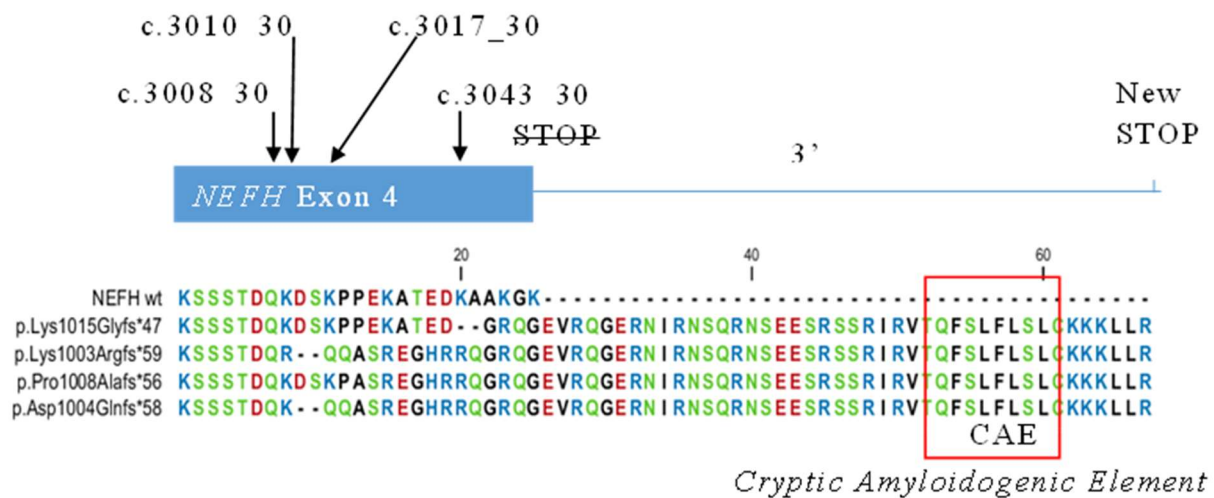


Figure 15: Représentation des mutations du gène NEF-H causant la perte d'un codon STOP provoquant l'ajout de 40aa supplémentaires dont un élément amyloïde cryptique (CAE).

F. Les neurofilaments

Le cytosquelette est un élément majeur de l'architecture cellulaire neuronale. Il est composé de 3 structures réparties selon leurs tailles : les microfilaments, les microtubules et les filaments intermédiaires³² (fig 16). Les neurofilaments (NF) sont les filaments intermédiaires des neurones. Ils ont un diamètre d'environ 10nm et sont exclusivement exprimés dans les neurones.

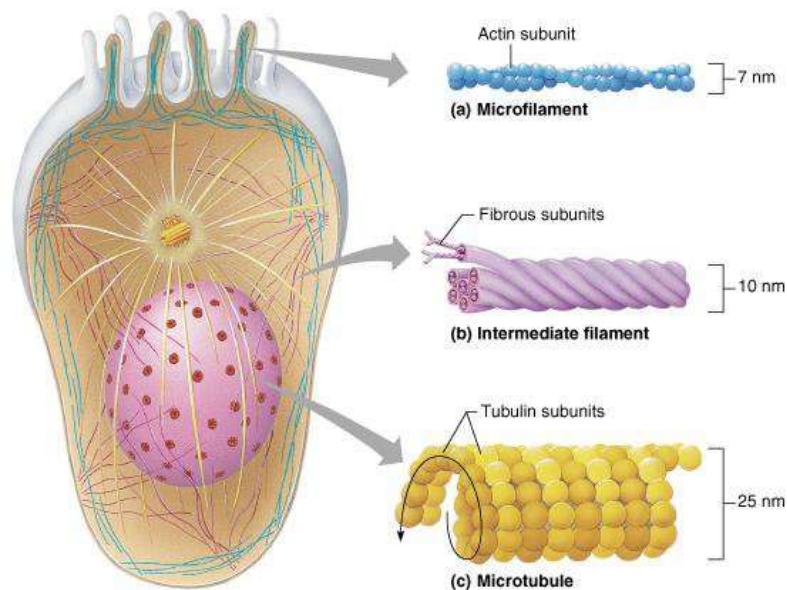


Figure 16: Schéma d'une cellule animale et de son cytosquelette (source J. Balzeau³²)

a. Structure des neurofilaments

Les NF font partie des filaments intermédiaires mesurant 10nm. Ils sont composés par trois sous-unités classées en fonction de leur poids moléculaire : chaînes lourdes (NF-H, 205 kDa), moyennes (NF-M, 160 kDa) ou légères (NF-L, 68 kDa)³³ (fig17). La purification par sédimentation différentielle montre que le ratio NF-L, NF-M et NF-H est de 5:2:1³⁴. NF-L est la sous-unité principale de ces neurofilaments du fait de sa capacité à former des homopolymères, favorisée par un domaine central de 310 acides aminés contenant de nombreux résidus hydrophobes. De cette façon, NF-L est la première sous-unité exprimée au cours de la différenciation des neurones. NF-H et NF-M forment des hétéropolymères en s'assemblant avec NF-L (fig 17). Ces hétéropolymères sont formés par les extrémités C-terminale de NF-M et NF-H. Les domaines N-terminaux des protéines NF-H et NF-M ont la particularité d'être riches en résidus Sérine (S) et Thréonine (T) et contiennent des motifs de type Lysine-Sérine-Proline (KSP). NF-M possède 13 motifs. NF-H possède une longue extrémité C-terminale avec 44 et 45 motifs KSP chez l'homme³⁵.

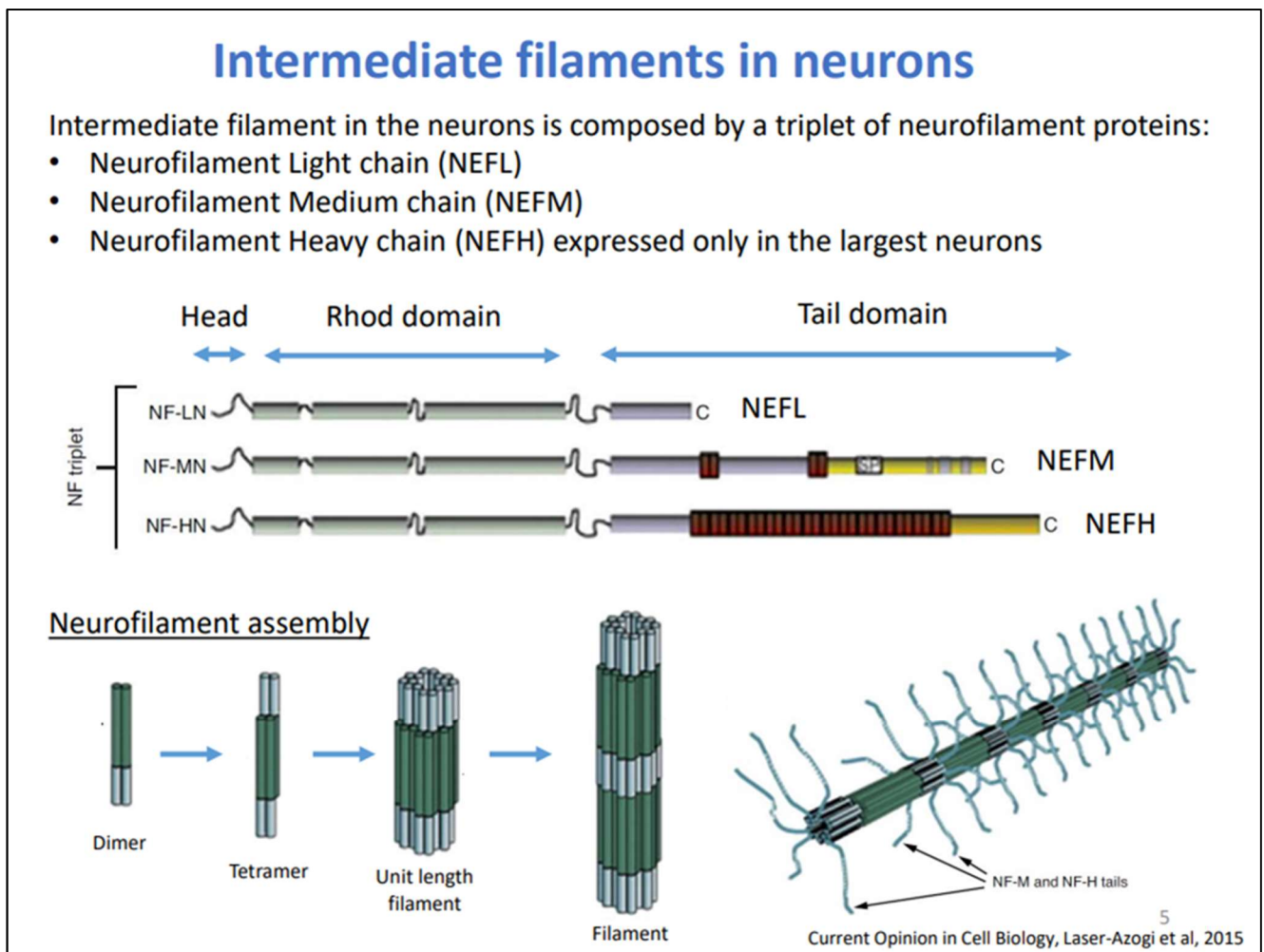


Figure 17 : Représentation des 3 types de neurofilaments et assemblage pour former le cytosquelette d'après Laser-Azogi et al 2015⁷.

b. Modifications post-traductionnelles des NF.

Les neurofilaments vont subir deux types de modifications post traductionnelles qui vont impacter divers processus: la phosphorylation et la glycosylation¹⁴. Ces deux modifications interviennent sur les parties C-terminales et N-terminales des 3 sous-unités (fig 18).

La phosphorylation des neurofilaments est la principale modification post traductionnelle des 3 sous unités. Elle est très régulée dans le temps et dans l'espace, elle implique des kinases spécifiques telles que des caséines kinases (CK1), des sérines kinases (GSK-3 α/β , cdk-5/p35) et des prolines kinases, (SAPK γ , p38 α kinase, Erk1 et 2, JNK3) et concerne les parties C-terminales et N-terminales³⁷. La phosphorylation en N-terminal joue un rôle dans l'assemblage et le désassemblage des neurofilaments¹⁴.

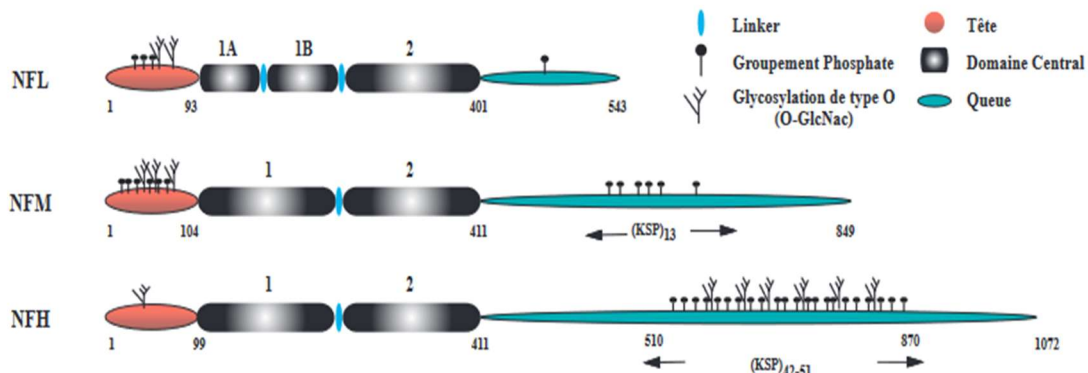


Figure 18: Structure des neurofilaments et modifications post traductionnelles. Les sites de phosphorylation (ballons noirs) et de glycosylation de type O (arbre) sont placés sur les NFs. Le nombre d'acides aminés est indiqué pour NF-L, NF-M, NF-H (exemple des protéines, la souris *mus musculus*; D'après Lee et al, 1996).

c. Fonction des NFs

1. Fonction n°1 : Croissance axonale

L'une des fonctions des filaments intermédiaires (FI) est de donner de la rigidité à la cellule³⁸. La fonction dépend de la composition et de l'emplacement des filaments. Les neurofilaments des neurones interviennent dans l'élongation de l'axone en le stabilisant. Si la quantité de neurofilaments diminue, l'élongation de l'axone ralentit et la morphologie des dendrites devient anormale^{14,39}.

2. Fonction n°2 : Augmentation du diamètre axonal

La seconde fonction fondamentale des neurofilaments est le contrôle du diamètre axonal. Le diamètre des axones influence la vitesse de conduction le long de l'axone. Par exemple, si la quantité de NF-L diminue, le diamètre axonal est réduit ce qui entraîne une diminution de la conduction nerveuse⁴⁰. L'expression de NF-H et NF-M est corrélée au degré de maturation des neurones et permet entre autre l'augmentation du calibre axonal^{14,36,41}

3. Fonction n°3 : Densité dendritique

Dans les motoneurones, la quantité de neurofilaments est très importante et va impacter l'arborisation dendritique. En effet, la surexpression de la protéine NF-M ou NF-H dans les motoneurones ou bien une déficience de NF-L perturbent l'arborisation dendritique^{42,43}.

4. Fonction n°4 : Vitesse de transport axonal

Les neurofilaments n'interviennent pas directement dans le transport axonal mais leurs interactions avec les microtubules *via* la protéine NF-H impactent la vitesse de transport. L'organisation et la quantité de NFs (notamment NF-H) stabilisent les microtubules. L'absence de NF-H par exemple, va augmenter la quantité de microtubules, ce qui impactera le transport axonal⁴⁴.

G. Les cellules iPS

Jusque dans les années 2000, les cellules souches embryonnaires humaines étaient utilisées pour étudier des pathologies dont les cellules n'étaient ni prélevables sans occasionner de dommages importants, ni amplifiables *in vitro*. Les cellules embryonnaires étant capables de se différencier dans les différents feuillettes embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme), elles peuvent potentiellement être différenciées dans tous les types cellulaires. Cependant, l'utilisation des cellules souches embryonnaires humaines pose de nombreux problèmes éthiques puisqu'elles proviennent d'un embryon humain.

En 2006, Yamanaka et son équipe ont réussi la prouesse scientifique de transformer des cellules différenciées en cellules souches pluripotentes, appelées *Induced pluripotent stem cells* (iPSc). Cette dédifférenciation des cellules a été rendue possible grâce à la réactivation de gènes associés à la pluripotence. 24 facteurs de transcription ont été testés par cette équipe pour obtenir des cellules pluripotentes. Yamanaka *et al*⁴⁵ ont ainsi pu identifier 4 facteurs de transcription capables de produire des cellules iPS : Oct3/4, Sox2, KLF4 et c-Myc. Cette approche permet de reprogrammer presque toutes les cellules différenciées de l'organisme en cellules iPS qui peuvent ensuite être différenciées dans le type cellulaire voulu (fig 19). Ces cellules présentent l'avantage d'être générées en grand nombre et permettent de reproduire en culture des pathologies liées à des mutations ou des altérations génétiques dans les cellules d'un patient. Dans le cadre des anomalies neurodégénératives, les cellules iPS permettent de travailler avec des types cellulaires non prélevables chez le patient permettant ainsi d'étudier le type cellulaire mis en cause dans la maladie (neurones, motoneurones, cellules cardiaques...).

Le protocole de Yamanaka *et al*, publié en 2006, utilise des vecteurs viraux intégratifs (lentivirus) pour insérer des gènes codant pour des facteurs de transcription et ainsi les exprimer. Comme le lieu d'insertion des virus dans le génome n'est pas contrôlé, cela pose néanmoins problème pour une utilisation dans le cadre de la médecine régénérative. Cependant de nouvelles techniques ont été développées pour exprimer les 4 facteurs dans les cellules sans intégration dans le génome (utilisation d'ARNm, adénovirus, molécules chimiques). La possibilité de générer des cellules en grande

quantité et de tous types cellulaires ouvre la voie à la médecine régénératrice en permettant théoriquement de réimplanter aux patients leurs propres cellules sans risque de rejet dans l'optique de réparer des organes ou tissus endommagés.

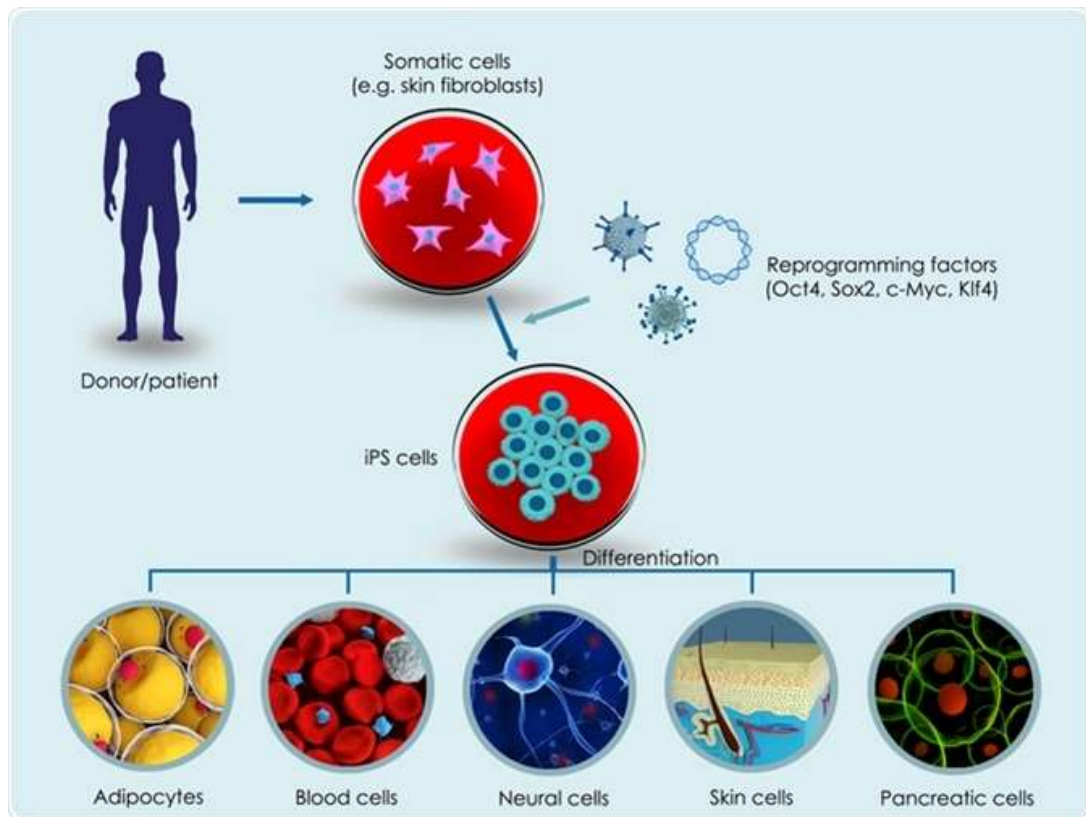


Figure 19: Schéma de reprogrammation de fibroblastes en cellules iPS à partir d'un donneur pouvant se différencier en différents types cellulaires. <https://www.news-medical.net/life-sciences/Genes-that-Control-Pluripotency.aspx>

III. Objectif du travail

Mon projet de diplôme d'EPHE a pour premier objectif la mise en œuvre du protocole de différenciation des cellules iPS en motoneurones au laboratoire Physiopathologie et Génétique du Neurone et du Muscle (PGNM). Le second objectif est d'utiliser cette technique pour analyser les mutations du gène *Neurofilament Heavy Chain* (NF-H) responsables d'une forme axonale à transmission autosomique dominante de la maladie de Charcot Marie Tooth.

Avant mon arrivée dans le laboratoire du Pr Schaeffer, Arnaud Jacquier avait démontré la pathogénicité de deux nouveaux variants NF-H par l'exploitation de modèles *in vitro* et *in vivo* dans lesquels la surexpression des variants induisait la formation d'agrégats protéiques.

Afin de compléter ce travail publié en 2017 et de confirmer le mécanisme pathophysiologique de la pathologie due à ces mutations, nous avons développé un modèle de culture cellulaire de motoneurones dérivés des cellules iPS des patients. Les fibroblastes issus des biopsies cutanées des deux patients ont été récupérés auprès de deux bio banques (CBC Biotec et Généthon) puis reprogrammés en cellules iPS par les plateformes CECS à Nantes et I-STEM à Paris.

Dans un premier temps, mon travail a consisté à mettre au point la différenciation de cellules iPS en motoneurones à partir d'une lignée iPS contrôle (AG08C5). Le protocole de départ utilisé pour la mise en place du modèle est basé sur la publication Maury *et al* de 2015².

Une fois le modèle mis en place et optimisé, je l'ai appliqué aux différentes lignées iPS issues des patients ainsi qu'aux lignées NF-H muté générées par CRISPR/Cas9 dans les cellules contrôles. Le but de cette étude étant de montrer que les mutations du gène NF-H provoquant la présence d'un élément amyloïdogénique induisent la formation d'agrégats protéiques dans les neurones lorsqu'il est exprimé de manière endogène. L'intérêt de ce travail est donc de : 1) compléter les résultats obtenus dans les modèles de surexpression et 2) développer une lignée cellulaire adéquate pour le développement d'un criblage *in vitro* de molécules pharmacologiques repositionnables (molécules possédant déjà une autorisation de mise sur le marché).

En parallèle, j'ai cherché à améliorer le modèle en réalisant des co cultures avec des motoneurones générés à partir des cellules IPS, des cellules de Schwann et/ou des progéniteurs musculaires (myoblastes). L'idée étant de tendre vers un modèle de tri-culture qui permettrait de se rapprocher du modèle *in vivo* et de pouvoir visualiser l'impact des mutations dans un environnement cellulaire interconnecté. L'objectif de mon mémoire est synthétisé dans la figure 20.

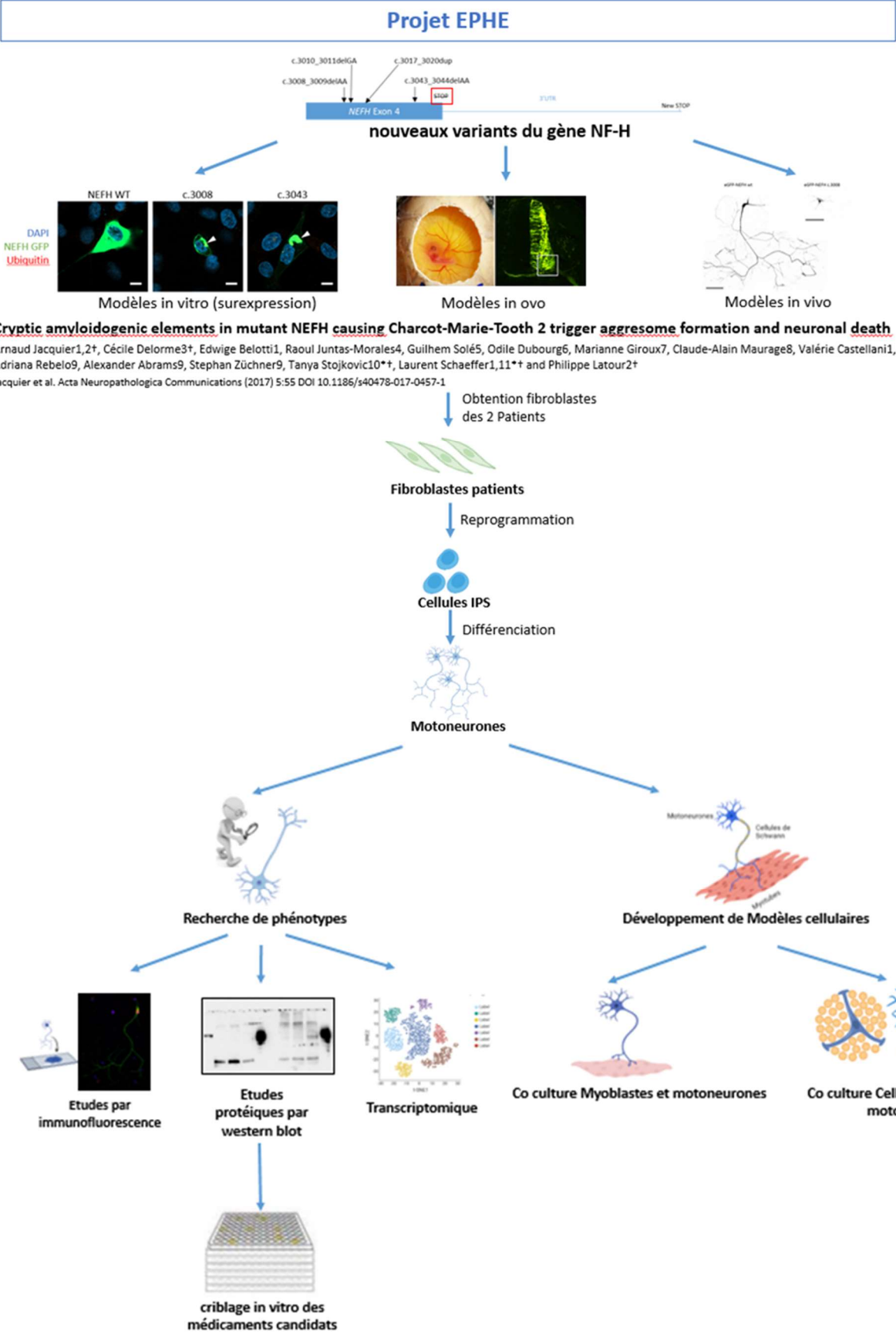


Figure 20: Schéma synthétique des différentes étapes de mon projet de recherche dans le cadre de mon diplôme de l'EPHE.

IV. Matériels et Méthodes

A. Cellules iPS

Des lignées iPS de patients ont été générées à partir de fibroblastes par la plateforme iPS de l'Université de Nantes et par la société Phenocell®. Les fibroblastes ont été obtenus à partir de la banque de cellules du Généthon et du Centre de Biotechnologie Cellulaire (Hospices Civils de Lyon). Les iPS AG08C5, qui ont été utilisés pour développer le modèle de différenciation, ont été fournis par la plateforme iPS de l'institut NeuroMyoGène. Cette lignée iPS a été générée à partir de fibroblastes provenant de l'institut Coriell qui ont été reprogrammés par la Plateforme de reprogrammation et différenciation cellulaire dirigée par Frédérique Magdinier à Marseille et finalement amplifiés et sauvegardés par le service iPS du laboratoire PGNM après validation des contrôles qualité.

Les cellules iPS sont cultivées en boîtes de diamètre 60mm coatées avec une matrice extracellulaire (Matrigel, Corning ref 354230) dans du milieu PSC-BREW (Miltenyi Biotec ref 130-127-865). Le milieu de culture est changé tous les jours jusqu'à obtention d'un tapis cellulaire à 90% de confluence. Les cellules sont alors dissociées enzymatiquement avec du TrypLE (Gibco 12-604-013) et réensemencées dans de nouvelles boîtes, congelées ou bien mises en différenciation pour obtenir des motoneurones.

B. Culture des motoneurones

Des motoneurones (MN) humains dérivés de cellules iPS ont été générés comme décrit précédemment par Maury et coll., 2015. Les cellules iPS humaines ont été dissociées avec du TryPLE (Gibco 12-604-013) et remises en suspension dans un milieu MNB contenant du DMEM-F12 Glutamax/Neurobasal (rapport 1:1 ; Gibco), supplément de N2/B27 sans supplément de vitamine A (rapport 1:2; Gibco), β -mercaptoéthanol (0,1 %; Thermo fisher 31350010), la pénicilline/streptomycine (0,1 %; Invitrogen 15140122), glutamax (0.5%, Gibco 35050061). Ce milieu est complété par de petites molécules dont SB431542 (20 μ M; TOCRIS ref 1614), LDN193189 (0,1 μ M; reprocell ref 04-0074), CHIR99021 (3 μ M; Tocris ref 4423) et Y-27632 (10 μ M; Tocris ref 1254) à DIV 0 (Day In Vitro # jours de culture in vitro). Les cellules ont été ensemencées en suspension dans des plaques 6 puits (Dutscher) traitées avec solution anti adhérence (ULA Ultra Low Attachment solution, ...) pour former des corps embryoides (EB). Pendant tout le processus de culture, de petites molécules ont été ajoutées à différents moments, y compris l'acide rétinoïque (0,1 μ M RA ; Sigma-Aldrich ref R2625), agoniste lissé (0,5 μ M SAG ; Sigma ref 566660), facteur neurotrophique dérivé du cerveau (10 ng/mL de BDNF; PreproTech 450-02 et GDNF, Peprotec ref 45013) et un inhibiteur de la γ -sécrétase (10 μ M DAPT; Tocris ref 2634). Ensuite, les EB ont été dissociés à DIV 9 (jours in vitro) et les progéniteurs hMNs ont été générés. Les cellules ont été ensemencées en 2D.

La méthode complète de culture des motoneurones humains issus de cellules iPS ainsi que l'optimisation sont décrites dans la partie IV et le protocole expérimental est inséré en annexe 2

C. Culture des cellules S16

La lignée cellulaire murine S16 de cellules de Schwann (ATCC; CRL2941 dérivée d'une culture primaire de cellules de Schwann isolées du nerf sciatique de *Rattus norvegicus*) a été décongelée et cultivée dans un milieu de culture *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) avec 10% de sérum bovin fœtal et 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco ref 15140-122). Les cellules sont passées au 1/10^{ème} 2 fois par semaine à l'aide de trypsine/EDTA (Gibco ref 25200.056).

D. Culture des myoblastes

Les myoblastes immortalisés fournis par l'institut NeuroMyoGène sont décongelés en milieu SMGM contenant 85% de Skeletal Muscle Growth Medium (Promocell ref C-23060) avec 10% sérum veau fœtal (Abcys ref S1810-500), 5% SMGM Supplement Mix (Promocell ref C-39365) et 1% Penicillin/Streptomycin 10000U (Gibco ref 15140-122). La culture estensemencée à faible densité et passée avant d'atteindre 50% de confluence pour éviter l'apparition de myotubes. Pour le repiquage des cellules, les cellules sont lavées une fois en PBS puis incubées 5min dans de la trypsine-EDTA (Gibco ref 25200-056). Les cellules sont récupérées avec du milieu de culture et réensemencées dans de nouvelles boîtes.

E. Co culture

A partir des motoneurons issus des cellules iPS (décrits précédemment), des modèles de cultures ont été développés avec les cellules de Schwann ou avec des myoblastes. Ces méthodes de culture sont décrites en partie IV de ce manuscrit.

F. Fabrication des puces en silicone

Des moules positifs en résine ont été conçus avec une imprimante 3D Phrozen - Sonic Mini 8K. La résine utilisée est une résine en photopolymère (Water-Washable Phrozen Référence : RS-PHR-WASH-MODELGRAY-1000). Le moule positif est ensuite placé dans le support de culture (lame Ibidi 4P ou plaque 24puits). Le silicone (BLUESIL™ RTV 3255 d'Elkem Silicones) est alors coulé dans le support et se réticule à température ambiante. Le moule positif est ensuite retiré formant ainsi la puce en négatif qui est passée dans 3 bains d'éthanol 70° pour rigidification et stérilisation. Les puces sont conservées à température ambiante dans de l'éthanol à 70° jusqu'à utilisation. Avant utilisation, les puces sont lavées 3 fois au PBS puis placées une nuit à 37°C dans du PBS pour éliminer l'éthanol et les résidus chimiques issus de la polymérisation du silicone.

G. Immunomarquages

Les MNs (motoneurons) ont été fixés en paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 10 minutes à température ambiante puis lavés 3 fois dans du PBS. Les cellules sont alors bloquées et perméabilisées en PBS avec 0,1% de Triton X-100, 0.1M de glycine et 1% d'albumine de sérum bovin (BSA) pendant 1h. Les anticorps primaires dilués dans la solution de blocage ont été appliqués sur les cellules pendant une nuit à 4 °C avant 3 lavages successifs des cellules en PBS. L'anticorps secondaire a ensuite été appliqué pendant 1 h à température ambiante en présence de DAPI, puis lavé 3 fois en PBS et monté dans FluoroMount (#00-4958-02; Thermo Fisher Scientific). La fluorescence a été observée sous un système d'imagerie EVOS M5000 et un microscope confocal Zeiss LSM880. Les images ont été analysées à l'aide des logiciels Fiji ImageJ et Metamorphe.

H. Western Blot

Les cellules ont été récupérées par décollement mécanique à l'aide d'un rateau dans du tampon de lyse RIPA (ref thermo Fisher 10230544) et du tampon d'échantillon 1× (biorad ref : 1610791). La concentration en protéines a été déterminée par la méthode de Bradford (Laboratoires Bio-Rad). 5 à 30 µg de protéines ont été déposés et séparés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE en présence de 2,2,2-trichloroéthanol (TCE, T54801, Sigma-Aldrich) pour des analyses de gel sans coloration. Les gels ont été transférés sur des membranes en difluorure de polyvinylidène (PVDF) (Millipore, IPVH0001 0. 45 µm, Millipore) ou nitrocellulose (Whatman Schleicher & Schuell référence : 10439196) par électrotransfert liquide (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20 % éthanol). Après saturation, les membranes ont été incubées avec l'anticorps primaire dans de l'albumine de sérum bovin (BSA) à 5% dans du Tris-Buffered Saline (tampon TBS ; UP74004B, Interchim) pendant une nuit à 4 °C. Les membranes ont été successivement lavées 3 × 5 min dans du TBS 0,1 % Tween-20 et ont ensuite été sondées avec des anticorps secondaires conjugués à la peroxydase de raifort pendant 1 h à température ambiante. Après trois étapes de lavage, l'immunodétection a été réalisée à l'aide du réactif ECLTM (Amersham). La révélation par Western blotting a été réalisée avec un système d'imagerie ChemiDocTM Touch et la quantification des immunoblots a été effectuée à l'aide du logiciel image lab (Bio-Rad Laboratories).

i. Anticorps

Les anticorps primaires utilisés sont listés dans le tableau 1 avec le nom du fournisseur, la référence du produit ainsi que la dilution réalisée en fonction de la technique.

Tableau 1 : Tableau des anticorps primaires utilisés

| Anticorps | FOURNISSEURS | RÉFÉRENCE | Dilution immunofluorescence | Dilution western blot |
|---------------------------------|----------------|------------|-----------------------------|-----------------------|
| Islet1 | R&D Systems | AF1837 | 1/500 | |
| Olig2 | Millipore | AB9610 | 1/200 | |
| Neurofilament M (NF-M) | Biolegend | BLE841001 | 1/1000 | 1/10000 |
| NF-L Antibody | Biotech NE | NB300-131 | 1/1000 | 1/10000 |
| NF H - Smi32 mouse | Biolegend | BLE801701 | 1/1000 | 1/5000 |
| p NF H sm31 mouse | Biolegend | BLE801602 | 1/1000 | 1/5000 |
| β -3-tubuline mouse | Biolegend | BLE 657402 | 1/1000 | 1/10000 |
| β -3-tubuline rabbit | Invitrogen | PA5-85609 | 1/1000 | |
| FoxP1 | R&D Systems | MAB45341 | 1/100 | |
| Acétylcholine transferase Tchat | Invitrogen | #PA5-29653 | 1/500 | |
| Tom20 | Cell signaling | #42406 | 1/200 | |

Pour le projet, deux anticorps ont été spécialement produits pour reconnaître la protéine mutée de NF-H. Pour ce faire, le peptide de 40 acides aminés qui sont ajoutés à la protéine mutée ont été injectés dans des lapins pour la fabrication d'anticorps capables de reconnaître la forme mutée de la protéine. Deux anticorps ont été reçus, nommés CAE1 et CAE2.

Les anticorps secondaires utilisés sont listés dans le tableau 2 avec le nom du fournisseur, la référence du produit ainsi que la dilution réalisée en fonction de la technique.

Tableau 2: Tableau des anticorps secondaires utilisés

| Anticorps | FOURNISSEURS | RÉFÉRENCES | Dilution immunofluorescence |
|----------------------|--------------|-------------|-----------------------------|
| Alexa 488 Dk-anti-Rb | Invitrogen | A21206 | 1/1000 |
| Alexa 555 Dk-anti-Ms | Invitrogen | A31570 | 1/1000 |
| Alexa 555 Dk-anti-Gt | Invitrogen | A21432 | 1/1000 |
| Alexa 555 Dk-anti-Rb | Invitrogen | A31572 | 1/1000 |
| 647 Dk-anti-Ms | Jackson lab | 715-606-151 | 1/1000 |
| Alexa 647 Dk-anti-Rb | Invitrogen | A31574 | 1/1000 |
| Alexa 647 Dk-anti-Gt | Invitrogen | A21447 | 1/1000 |
| DAPI | Sigma | D9542 | 1/2500 |

J. Transcriptomique

Les progéniteurs de motoneurons ont été ensemencés au jour 9 de différenciation à raison de 600 000 cellules par boîte de 60mm de diamètre coatées avec un mélange

de polyornithine et de laminine. La différenciation a été poursuivie jusqu'à J24. A J24, les cellules ont été récupérées et congelées à -80°C. L'ARN a été extrait des motoneurons dérivés des cellules iPS humains à l'aide du RNeasy Mini Kit (Qiagen) puis dosés au nanodrop et contrôlés sur gel agarose. Les ARN ont été transmis à la société I-STEM pour contrôle. La qualité des ARN est vérifiée en calculant le RIN (*RNA Integrity number*) en utilisant le Bioanalyseur 2100 (Agilent) selon les instructions du kit Agilent Nano kit (seul les ARN possédant un RIN supérieur à 7 sont utilisés pour le séquençage).

Le RNAseq a été réalisé en utilisant le kit *Quantseq 3'mRNAseq library prep kit FWD for illumina* (Lexogene) permettant de générer un seul fragment d'ADNc par transcrit. Pour chaque échantillon, 100 ng d'ARN total sont utilisés pour construire les bibliothèques d'ADNc en suivant le protocole du kit Quantseq 3'mRNAseq library prep kit FWD (illumina). La rétrotranscription des ARNm en ADNc est initiée via des primers OligoT complémentaires de la queue polyA des ARNm. Après la synthèse du premier brin, l'ARN est dégradé et la synthèse du second brin est initié avec des amorces de séquences aléatoires. Les bibliothèques sont ensuite étiquetées et amplifiées avec 17 cycles de PCR puis quantifiées et qualifiées en utilisant le Bioanalyseur 2100 (Agilent) selon les instructions du kit Agilent High Sensitivity DNA kit. Le séquençage sur le Nextseq 550 (Illumina High output 2*75pb run) est ensuite réalisé. A l'issue du séquençage, un fichier FASTQ est généré pour chaque échantillon via Generate FASTQ sur Local Run Manager (Illumina). Le contrôle-qualité des FASTQ est réalisé à l'aide de l'outil FastQC (v 0.11.9) sur les clusters de calcul du PSMN (Pôle Scientifique de Modélisation Numérique, Lyon, France). Deux filtres sont réalisés sur l'ensemble des données à l'aide de l'outil Prinseq (v 0.20.4, <http://prinseq.sourceforge.net/>) [A] afin de retirer les lectures possédant un score de qualité (Phred score) moyen inférieur à 20 et de couper la queue des lectures (*trimming*) ayant un score par bases inférieur à 20. Nous avons également filtré les amorces encore présentes et retirer les lectures d'une taille inférieure à 25 paires de base avec l'outil Cutadapt (v 0.1.18) [B]. Les lectures sont ensuite alignées sur le génome de référence humain hg38 (GRCh38.99 Ensembl) à l'aide de l'outil STAR (v 2.7.6a) [C]. Les données sont ensuite filtrées en utilisant Samtools (v 0.1.13) [D] afin de ne conserver que les alignements uniques de bonne qualité (score d'alignement supérieur à 10). Le comptage des lectures par gène est réalisé avec l'outil HTSeq-count (v 1.99.2) [E] puis l'outil R (v 4.1.2) [F] et son package DESeq2 [G] est ensuite utilisé pour l'analyse d'expression différentielle des gènes. Nous considérons que les gènes sont significativement différentiellement exprimés lorsque leur valeur moyenne d'expression (BaseMean) est supérieure à 20, que leur différence d'expression entre les deux conditions ($|\log_2\text{FoldChange}|$) est supérieure à 0.4 et que la p-value corrigée (Méthode de correction de Benjamini-Hochberg) soit inférieure ou égale à 0.05.

V. Résultats

A. Développement du modèle cellulaire de motoneurones

A partir de l'article de Maury *et al* de 2015⁴⁶, j'ai développé et optimisé la différenciation des cellules iPS en motoneurones spinaux. La spécification de l'identité cellulaire au cours du développement embryonnaire dépend de l'exposition des cellules à des séquences de signaux extrinsèques délivrés à des moments, des temps et des concentrations précises. Durant l'embryogenèse, moins d'une douzaine de voies de signalisation sont utilisées pour spécifier tous les types de cellules⁴⁷. L'exposition des cellules iPS aux combinaisons pertinentes de molécules de signalisation à des concentrations appropriées et à des moments précis du processus de différenciation devrait donc permettre la génération efficace des cellules d'intérêts. Le protocole utilisé pour générer les motoneurones s'effectue en 2 temps avec la différenciation des cellules iPS en progéniteurs de neurones de la moelle épinière puis l'induction des progéniteurs en motoneurones matures.

a. Culture des motoneurones

1. Obtention de progéniteurs de motoneurones à partir de cellules iPS

Le protocole établi par Maury *et al*⁴⁶ utilise des composés permettant d'activer ou d'inhiber des voies de signalisations (tableau 3) poussant la différenciation des cellules iPS en motoneurones. La culture des progéniteurs est réalisée dans des supports de culture traités pour empêcher l'adhésion des cellules (plaque *Ultra low attachment* ou traitement avec solution anti adhérence), ce qui permettra d'obtenir des sphéroïdes en suspension (fig 21A).

Tableau 3: Liste des composés permettant la différenciation des cellules iPS en motoneurones

| | |
|------------------|--|
| SB431542 | inhibiteur sélectif et puissant de la voie du TGF- β /Activine/NODAL qui inhibe les protéines ALK5 et ALK7 en rivalisant pour le site de liaison à l'ATP. |
| Y-27632 | Y-27632 est un inhibiteur de la protéine kinase (ROCK) associée à Rho. Y-27632 inhibe à la fois ROCK1 et ROCK2. |
| CHIR 99021 | CHIR 99021 est un inhibiteur de la glycogène synthase kinase 3 (GSK-3). Agit comme activateur de la voie canonique Wnt. |
| LDN-193189 | inhibiteur des récepteurs ALK2 et ALK3 de la voie <i>bone morphogenetic protein</i> (BMP). Cette voie coordonne le schéma de développement et joue un rôle physiologique essentiel |
| Acide rétinoïque | L'acide rétinoïque est un dérivé de la vitamine A qui fonctionne comme un ligand pour le récepteur de l'acide rétinoïque (RAR). |
| SAG | SAG module le couplage du Smo avec son effecteur en aval en interagissant avec Smo. SAG induit l'activation de la voie Shh. |
| DAPT | DAPT est un inhibiteur de la γ -sécrétase de la voie NOTCH |
| BDNF | Le BDNF fait partie de la famille des facteurs de croissance neurotrophique du NGF. BDNF soutient la prolifération et la survie des neurones. |
| GDNF | Le GDNF est un facteur neurotrophique homodimérique. GDNF améliore la survie |

L'ajout de ces facteurs à des temps différents permet d'atteindre le stade de progéniteurs neuronaux qui forment des sphères compactes de formes rondes (fig 21C). Ces étapes sont notamment décrites dans plusieurs publications^{46,48,49} et soulignent l'aspect séquentiel de la conversion des cellules iPS en progéniteurs (fig 21A). On retrouve dans ces publications des similitudes concernant la concentration et la durée des molécules. Nous utilisons par exemple comme inhibiteur de Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) la molécule Chir99021 à 3 μ M jusqu'au jour 6. L'inhibition de *Transforming growth factor beta* (TGF- β) et *bone morphogenetic protein* (BMP) avec, respectivement, du SB431542 à 20 μ M et LDN193189 à 0.1 μ M est effectuée du jour 0 au jour 6. L'acide rétinoïque (RA) et le *Smoothened agonist* (SAG) sont ainsi ajoutés au jour 2 jusqu'au jour 9 (jour d'obtention des progéniteurs). La concentration de ces facteurs a été optimisée à 100nM pour le RA et 500nM pour le SAG⁴⁶. Afin de favoriser la croissance et la survie des neurones en développement, l'ajout de facteurs neurotrophiques *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) est nécessaire à une concentration de 10 μ g/ml à partir du jour 6. Le planning d'ajout des compléments est schématisé dans la figure 21. Les différentes voies de signalisation citées ci-dessus sont représentées dans l'annexe 1.

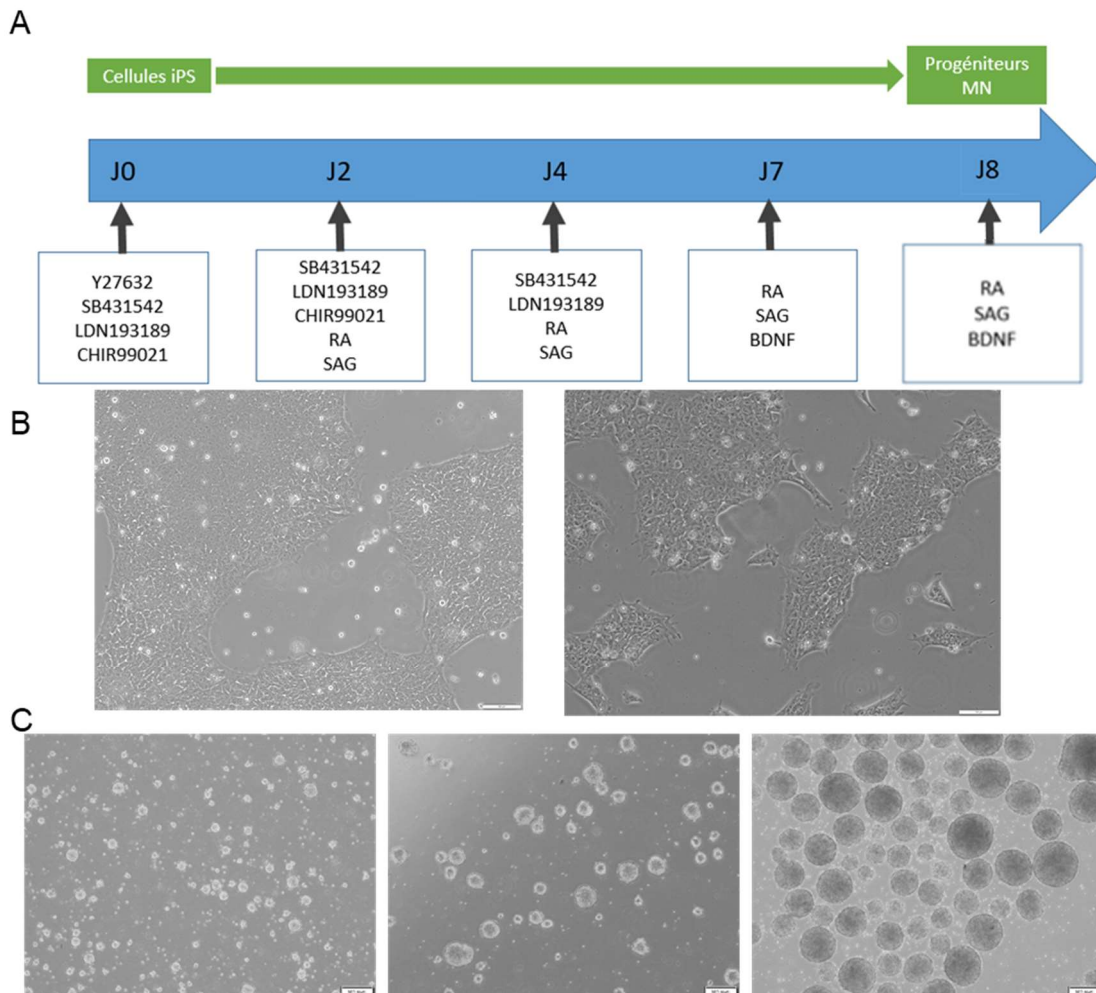


Figure 21: L'ajout des facteurs extrinsèques à des jours différents permet la différenciation des cellules iPS en progéniteurs de motoneurones.

A) Protocole et petites molécules utilisés aux différents temps de culture pour obtenir des progéniteurs de motoneurones spinaux (BDNF = facteur neurotrophique dérivé du cerveau ; GDNF = facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales ; RA = Acide rétinoïque). B) Images des cellules iPS (lignée AG05C5) grossissement x10 barre d'échelle : 100 μ m. C) Image au microscope en contraste de phase des corps embryoïdes à 3 temps de différenciation (gauche = jour 2, Milieu = jour 4, droite = jour 8 de différenciation). Grossissement x4. Barre d'échelle = 200 μ m

2. Obtention de motoneurones à partir des progéniteurs

La seconde phase de culture s'effectue en adhérence. Au jour 10, les sphéroïdes sont dissociés par du TrypLE permettant d'individualiser les cellules. Dès J14, le protocole de culture à partir de progéniteurs permet d'obtenir de jeunes motoneurones encore immatures en terme d'électrophysiologie et des motoneurones matures à partir du jour 25⁴⁶ (fig 22B image de droite). Au jour 10, les progéniteurs ont adhéré au support avec apparition d'ébauches d'axones et dendrites (fig 22B gauche). Au fur et à mesure du temps, les axones augmentent en longueur et en largeur. Les corps cellulaires ont tendance à se regrouper pour former des amas (fig 22B droite).

Du jour 10 au jour 14, le milieu de culture est complété avec du RA et SAG aux mêmes concentrations que la première phase. L'ajout de DAPT à 10 μ M (inhibiteur de la γ -secrétase) permet l'induction de tous les progéniteurs en motoneurones et de bloquer la prolifération cellulaire. Deux facteurs neurotrophiques, le BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) et le GDNF (*Glial Derived Neurotrophic Factor*) sont utilisés pour la survie cellulaire des motoneurones. A partir du jour 14, seuls le BDNF et le GDNF sont conservés. Ces différentes phases sont schématisées en figure 22A.

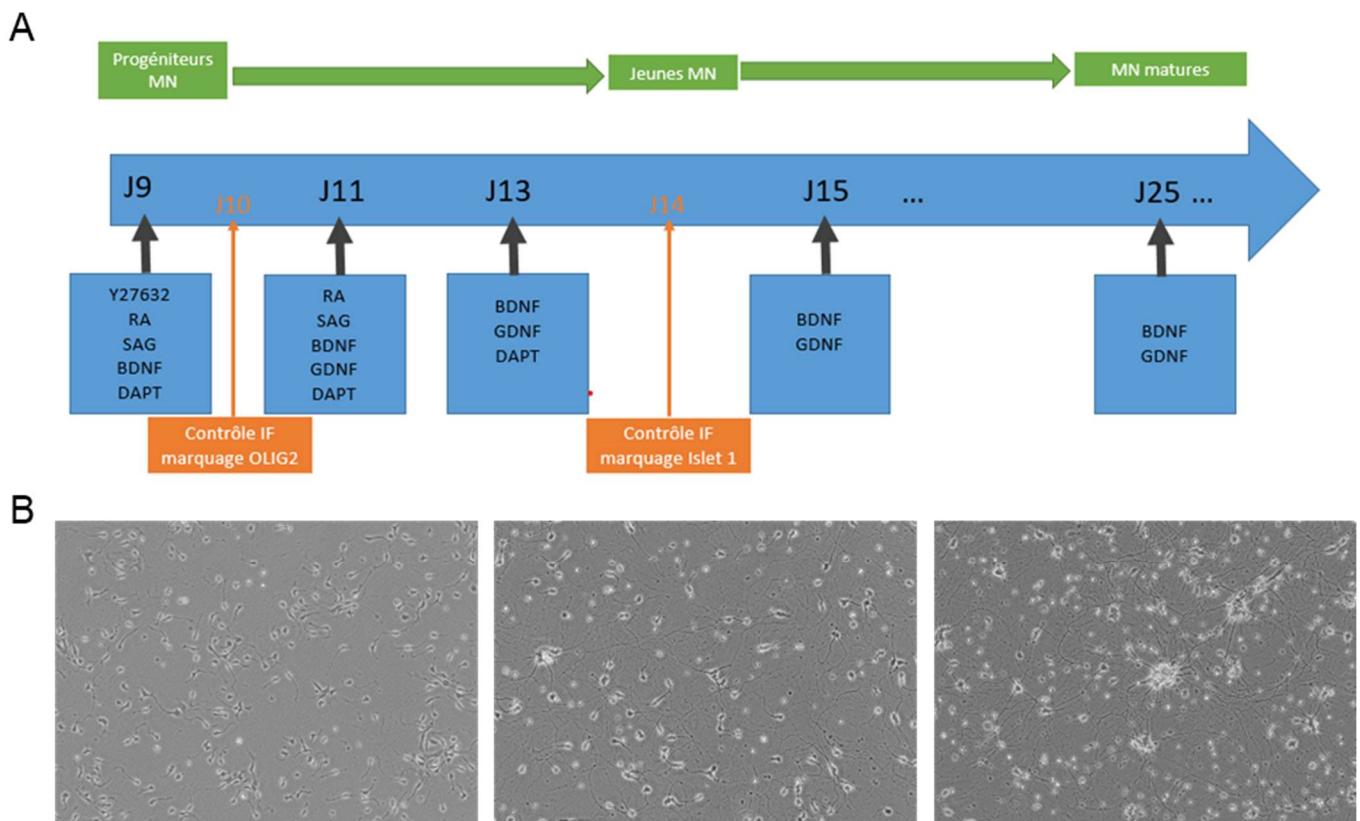


Figure 22 : Induction des progéniteurs en motoneurones après dissociation des corps embryoïdes.

A) Protocole et petites molécules utilisées aux différents temps de culture pour obtenir les motoneurones spinaux (BDNF = facteur neurotrophique dérivé du cerveau ; GDNF = facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales ; RA = Acide rétinoïque). Les contrôles de différenciation par marquages de protéines spécifiques par immunofluorescence sont effectués au J10 et J14 (photos non présentées). B) Images au microscope à contraste de phase des motoneurones à 3 temps de différenciation (gauche = jour 10, Milieu = jour 14, droite = jour 20 de différenciation). Grossissement x10. Barre d'échelle = 100 μ m

3. Contrôles qualités de la différenciation

Afin de contrôler la différenciation, des immunomarquages ont été réalisés afin de valider la présence de la protéine OLIG2 (*Oligodendrocyte transcription factor*) (fig 23A) et celle du marqueur de motoneurones Islet1 (*Insulin gene enhancer protein ISL-1*) (fig 23B). La quantification des cellules OLIG2 positives par rapport au nombre de cellules totales (défini par le nombre de noyaux visualisés grâce au DAPI) permet de déterminer le pourcentage de pureté en progéniteurs de motoneurones au jour 10. Ce pourcentage doit être proche des 80%. En dessous de ce pourcentage, les analyses effectuées ainsi que l'interprétation des résultats ne seront pas représentatives du type cellulaire désiré. La quantification des cellules Islet1 positives par rapport au nombre de cellules totales (DAPI) permet de déterminer le pourcentage de pureté en motoneurones au jour 14. Selon les indications de la société I-Stem, le pourcentage doit être supérieur à 70% pour valider le lot de motoneurones produits et pouvoir utiliser les cellules. Afin de visualiser l'axone des motoneurones, un marquage des neurofilaments (NF-M (fig 23B) ou NF-H ou NF-L) ou encore les microtubules spécifiques (β 3-Tubuline (TUJ1) fig 23A) peut être réalisé.

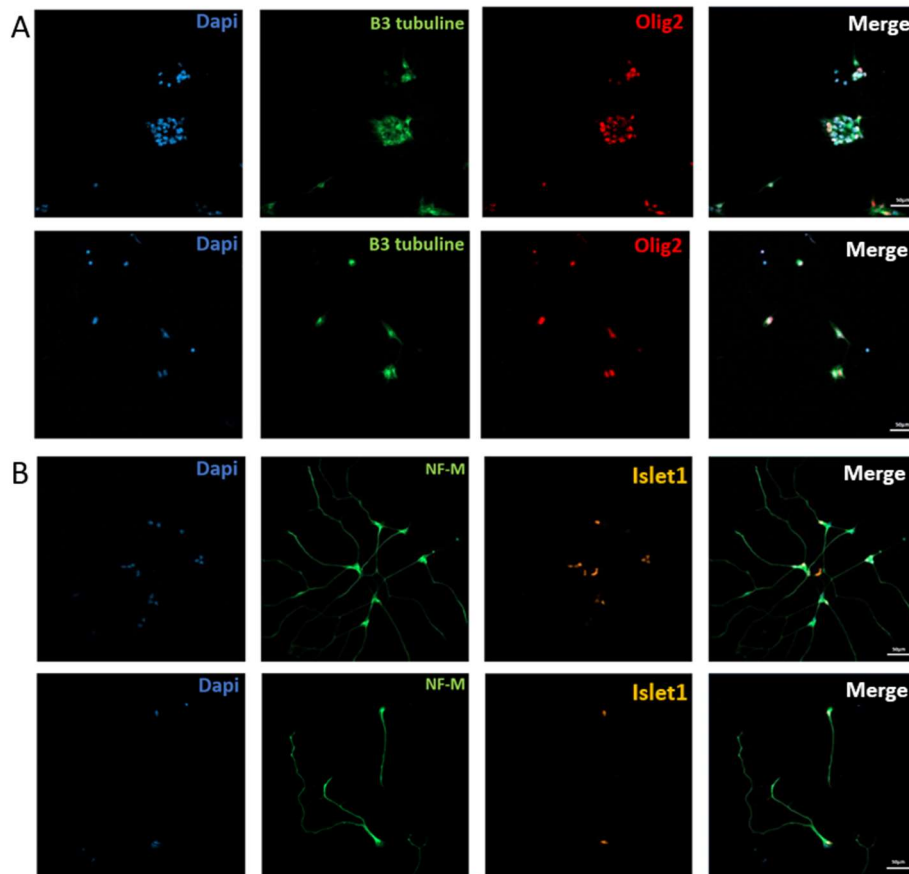


Figure 23: Immunofluorescence des cellules obtenues au jour 10 et jour 14 de différenciation.

A) Un anticorps anti- β 3-Tubuline (Tuj1, vert) et Olig2 (rouge) marquant spécifiquement les progéniteurs de motoneurones ont été utilisés ainsi que le DAPI (bleu) pour visualiser la totalité des noyaux des cellules. B) Un anticorps anti-neurofilament M (NF-M, vert) et Islet-1 (orange) marquant les jeunes motoneurones ont été utilisés ainsi que le DAPI (bleu) pour visualiser la totalité des noyaux des cellules. Imagerie confocale LSM80. Grossissement x20. Barre d'échelle = 50 μ m

Pour mesurer la pureté en motoneurones, 15 champs ont été imagés avec les différents immunomarquages et analysés avec le logiciel Metamorph qui permet de quantifier le nombre de cellules ayant un marquage Olig2 ou Islet1 par rapport aux cellules totales (marquées au DAPI). L'obtention de 80% de cellules Olig2 positives (fig 23A) et 70% de cellules Islet1 positives (fig 23B) permet de valider le lot et donc de pouvoir utiliser ces cellules pour les tests. Le marquage NF-M permet de visualiser les axones et de confirmer l'obtention de croissances axonales des motoneurones. Un exemple de résultats des contrôles qualités de la différenciation n°2 est représenté dans le tableau 4 et dans la figure 24.

Tableau 4: Résultats des contrôles qualités des progéniteurs et motoneurones obtenus à J10 (Olig2) et à J14 (Islet1) pour la différenciation n°2 de 4 lignées iPS. Résultats obtenus par comptage des cellules marquées OLIG2+ ou Islet1+ par rapport au cellules totales (DAPI) exprimés en pourcentage.

| Contrôle Qualité des motoneurones de la différenciation n° 2 | | | | |
|--|-------------|------------------|-------------|--------------------|
| | % Olig 2 + | Ecart type Olig2 | % Islet1 + | Ecart type Islet 1 |
| PC167 | 77,0 | 7,8 | 68,4 | 15,2 |
| PC196 | 83,7 | 2,3 | 72,6 | 7,4 |
| PC56 hmz | 80,0 | 2,9 | 76,3 | 4,4 |
| PC56 wt | 81,2 | 3,0 | 71,7 | 4,8 |

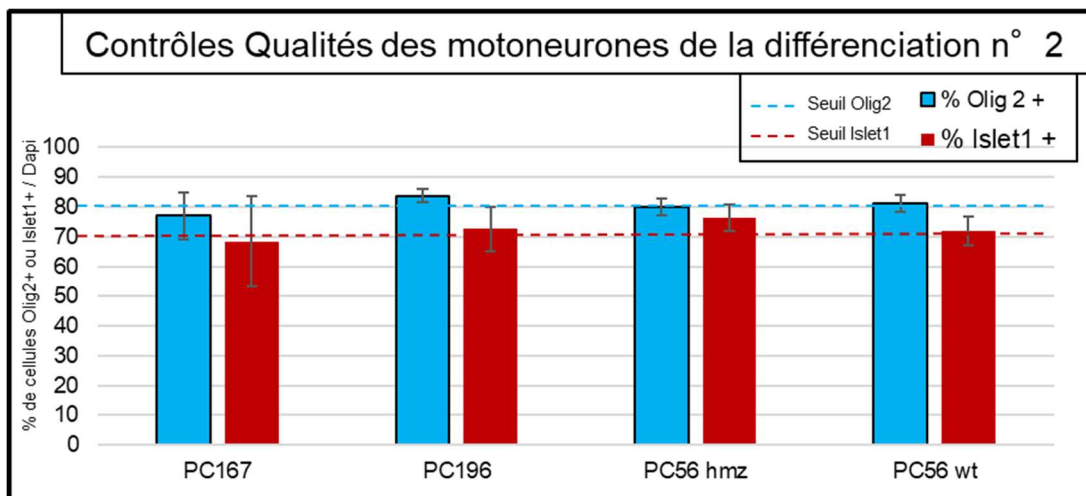


Figure 24: Représentation graphique des résultats des contrôles qualités des progéniteurs et motoneurones obtenus à J10 (Olig2) et à J14 (Islet1) pour la différenciation n°2 de 4 lignées iPS.

Résultats obtenus par comptage des cellules marquées Olig2+ ou Islet1+ par rapport aux cellules totales (DAPI) exprimés en pourcentage. Les seuils d'acceptabilités de 70% pour iSLET et 80% pour Olig2 sont représentés par des lignes en pointillé. PC196 lignée iPS wt, PC167 lignée iPS patient NF-H mutée, PC56 lignée iPS mutée homozygote NF-H, PC56wt lignée contrôle.

b. Optimisation de culture de la différenciation

En culture, les motoneurones se regroupent en petits amas de cellules, ce qui rend difficile le comptage des cellules et la détermination de la croissance axonale de chaque motoneurone. J'ai donc testé différents supports et coating pour essayer de diminuer le phénomène de regroupement (fig 25A). De plus, les cellules non différenciées (Islet1 négatives) prolifèrent jusqu'à former un tapis cellulaire (fig 25B). Ces deux phénomènes provoquent un décollement précoce des cellules au cours de la différenciation et rendent difficile le comptage des cellules, ce qui risque de fausser les résultats des différentes analyses réalisées avec ces cellules (Western Blot, transcriptomique). Il est donc nécessaire d'améliorer les conditions de culture pour limiter ces deux problèmes.

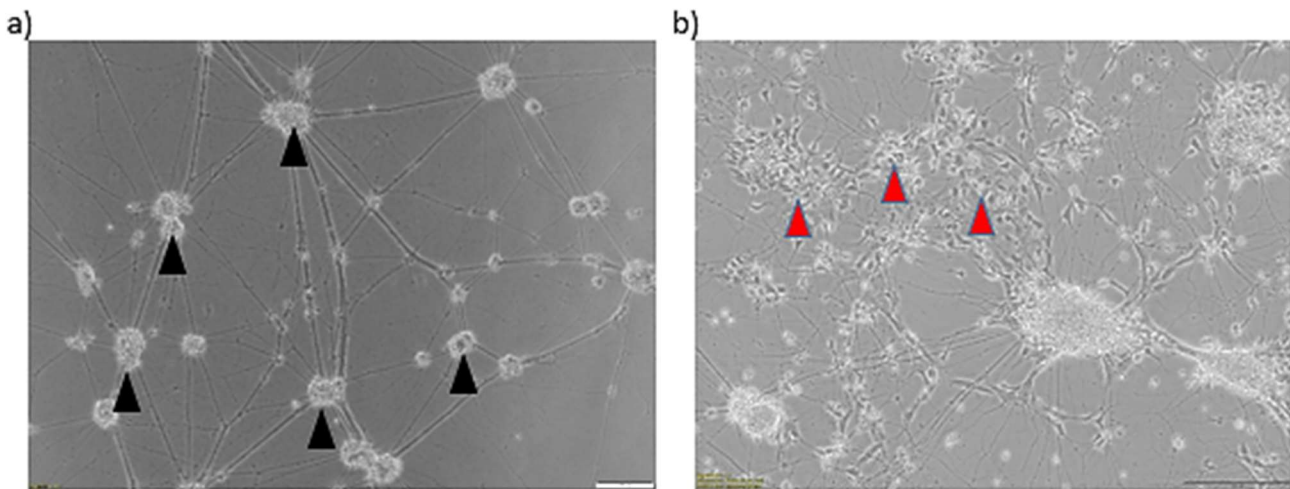


Figure 25: Culture des motoneurones avec la présence d'une population cellulaire proliférante (flèches rouges) et de regroupement des cellules en amas (flèches noires). A) Regroupement de cellules qui augmente leur détachement au cours du temps. B) Tapis cellulaire de cellules non différenciées en motoneurones. Grossissement x10 barre d'échelle : 100 μ m

1. Support de culture

Afin d'améliorer l'homogénéité de la culture, différents types de supports ont été testés tels que des plaques 96 puits, des plaques 24 puits ou bien encore des boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre avec des revêtements de surface (*Coating*) différents. Ces différents supports font varier la surface de culture et le volume de milieu. Plus le support est grand, plus les vibrations des incubateurs ou des hottes vont être importantes ce qui va provoquer le rassemblement des cellules et leur décollement. Comme mentionné dans Maury *et al*, les supports de culture doivent être coatés pour faciliter l'adhérence et la survie des motoneurones. Lors des premières cultures, la conservation des cellules de manière isolée a été difficile et la survie inférieure à 25 jours due à un décollement précoce des corps cellulaires regroupés comme le montre la figure 25A. Il a donc fallu optimiser le coating et la densité cellulaire ensemencée par type de support.

J'ai comparé des *coatings* de Matrigel (Corning) et de mélanges de Poly Ornithine (PO) et de laminine, avec différentes concentrations en laminine. Le meilleur résultat a été obtenu avec la PO/Laminine à une concentration en laminine de 2µg/ml. En effet, ce mélange permet d'obtenir des cellules plus isolées, ce qui favorise la visualisation de la croissance axonale et de la morphologie cellulaire (données non présentées). Les conditions que j'ai établies permettent d'obtenir des agrégats beaucoup plus petits (5 à 10 cellules) qui permettront de faire les analyses de croissance axonale par neurone en visualisant chaque corps cellulaire et l'axone correspondant.

2. Élimination des cellules non différenciées

Le second problème dans nos cultures est l'envahissement par des cellules mitotiques. En effet, on estime qu'une culture au jour 14 passe les contrôles qualité quand au moins 70% des cellules sont des progéniteurs de motoneurones Islet1 positifs. Le taux de 100% n'étant jamais atteint, il subsiste une faible proportion de cellules non caractérisées (autres types neuronaux ou cellules gliales...) qui peuvent parfois proliférer. Lors de la deuxième phase de culture en adhérence, les cellules qui ont conservé leur capacité proliférative vont se multiplier jusqu'à former un tapis cellulaire. Cette population cellulaire est gênante à plusieurs titres : 1) elle change l'adhérence des neurones, 2) elle consomme les apports nutritifs du milieu de culture ce qui peut appauvrir certains composés essentiels aux neurones, 3) elle perturbe la visibilité et le comptage des neurones et 4) elle apparaît parfois de façon aléatoire dans quelques puits augmentant la variabilité inter-puits. Le DAPT, un inhibiteur de la γ -secrétase est censé limiter la prolifération de ces cellules mais il ne semble pas suffisant dans notre cas. J'ai donc testé un autre antimitotique pour éliminer ces cellules non différenciées. J'ai ajouté du 5-Fluoro-2'-deoxyuridine (5FdU) au jour 12 pendant 24h à 40µM. Le 5FdU est un inhibiteur de la thymidylate synthase nécessaire à la synthèse des bases Thymine de l'ADN, bloquant ainsi la réplication de l'ADN et provoquant la mort des cellules cyclantes. Étant donné que les motoneurones à J12 sont déjà post-mitotiques, ils ne sont pas affectés par l'ajout d'anti-mitotiques. Cette approche a permis de diminuer drastiquement la proportion de cellules non différenciées et d'obtenir une culture beaucoup plus pure en motoneurones avec possibilité de maintenir la culture au-delà de 30 jours de différenciation. Dans les images des cultures de la figure 26, l'ajout de 5FdU a permis de diminuer la prolifération des cellules et de limiter le regroupement des motoneurones en amas (fig 25A vs B). Les axones restent bien ancrés sur le fond du support. On a donc moins de décollement de cellules lors des changements de milieu et le réseau axonal est beaucoup plus homogène sur toute la surface du support.

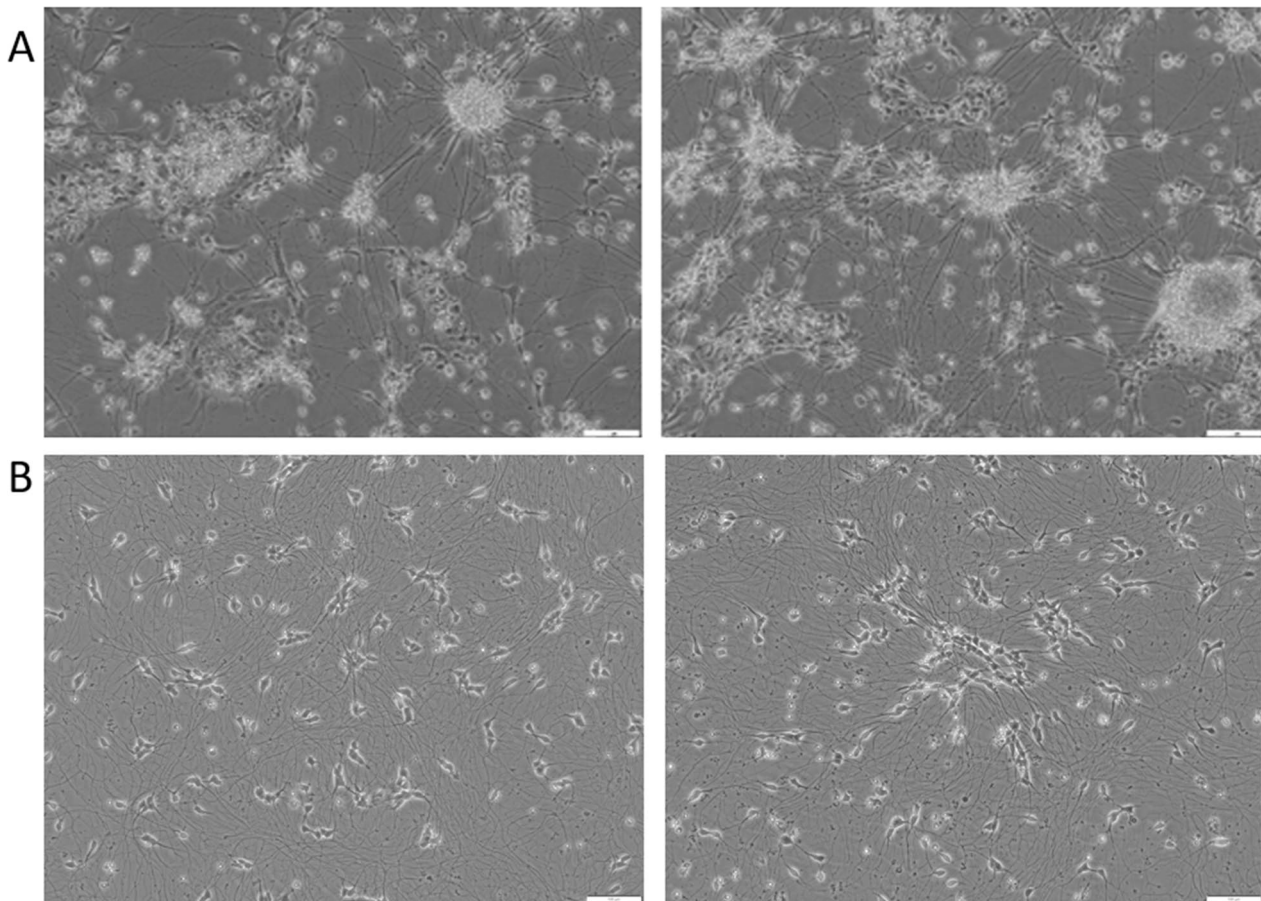


Figure 26 : Image de cellules non différenciées dans les cultures après 31 jours de différenciation grâce à l'ajout de 5FdU.

A) Culture de Motoneurones sans 5FdU B) Culture de Motoneurones traité 48h avec 5FdU à 40 μ M aux jours 15 et 16 de différenciation. Grossissement x10 barre échelle=100 μ m

c. Autres modèles en développement

La maîtrise de ce modèle de culture des motoneurones dérivés de cellules iPS nous a permis d'envisager le développement de nouveaux modèles plus complexes tenant compte des interactions cellulaires *in vivo*. Dans un premier temps, je me suis intéressé à la culture en 3 dimensions. Dans cette culture, les sphéroïdes de progéniteurs neuronaux, obtenus au jour 9, ne sont plus dissociés mais placés dans une goutte de matrigel. Ainsi, la différenciation et la maturation en motoneurones se poursuivent dans un environnement 3D reflétant un peu plus le développement de la moelle épinière.

Dans un second temps, je me suis intéressé au modèle de co-culture des motoneurones avec deux types cellulaires présents dans le système nerveux périphérique. Pour ce faire, j'ai placé les motoneurones en co-culture avec des cellules musculaires (myoblastes/myotubes) afin de recréer des jonctions neuromusculaires ou en co-culture avec des cellules de Schwann (lignée S16, ATCC) afin de tester leur apport trophique et leur capacité myélinisante.

1. Culture 3D des motoneurones

La culture des motoneurones en 3 dimensions présente des particularités dont nous pouvons tirer avantage. Tout d'abord, les cellules se différencient et mûrissent dans un environnement cellulaire plus riche. Or, nous avons constaté que lors de la maturation des cultures de motoneurones en 2D, les corps cellulaires avaient tendance à se regrouper naturellement avec le temps (fig 25). De plus, le fait de travailler avec les sphéroïdes de MNs regroupant tous les corps cellulaires permet de mesurer plus facilement la taille des axones qui en émergent.

Pour ce faire, nous avons débuté la culture à partir du même protocole de différenciation. Au neuvième jour de différenciation, les sphéroïdes sont individualisés dans une boîte de pétri avec 20µl de milieu (MNBJ9). Puis 20µl de matrigel pur sont ajoutés sur le sphéroïde et homogénéisés avec le milieu. Rapidement, le sphéroïde et 20µl de mélange MNBJ9/Matrigel sont placés en goutte dans le support de culture. Plusieurs sphéroïdes sont ainsi mis en culture dans la boîte (fig 27A). La boîte est ensuite mise à l'envers à 37°C le temps que le matrigel polymérise. Cela permet aux sphéroïdes d'être inclus dans la goutte sans être en contact avec le fond de la boîte. Une fois le matrigel polymérisé, la boîte est retournée et le milieu de culture (MNBJ9) est ajouté. Dès le lendemain les sphéroïdes sont observés et de petits prolongements apparaissent sur le pourtour des sphéroïdes (fig 27 B). Ces prolongements vont continuer à s'étendre au fur et à mesure des jours (fig 27C). Il est possible de mesurer la pousse axonale avec le logiciel d'imagerie en microscopie optique au cours des jours ou en vidéo-microscopie. De plus, le fait que tous les axones s'étendent de façon radiale par rapport au sphéroïde permet de discriminer les transports rétrogrades et antérogrades, ouvrant des perspectives d'étude du transport axonal en utilisant des marqueurs tels que les mitochondries ou des toxines couplées à un fluorochrome comme le fragment C non toxique de la toxine C tétanique (TTC-eGFP).

Cette technique pourrait donc être utile pour analyser l'effet d'une mutation sur la croissance axonale et le transport axonal.

Il est aussi possible de fixer les cellules au PFA et de réaliser des immunomarquages des sphéroïdes pour visualiser différents compartiments ou protéines cellulaires. La figure 21 D montre le marquage d'un sphéroïde avec les noyaux (marquage DAPI) regroupés et les axones marqués avec un anticorps anti NF-H phosphorylé (pNF-H) et un anticorps anti β 3-tubuline. Ces images montrent la répartition des axones cherchant leurs cellules cibles tout autour de la sphère de noyau. Il est à noter que certains axones semblent aussi se regrouper sur un tronc commun ressemblant aux prémices d'un nerf.

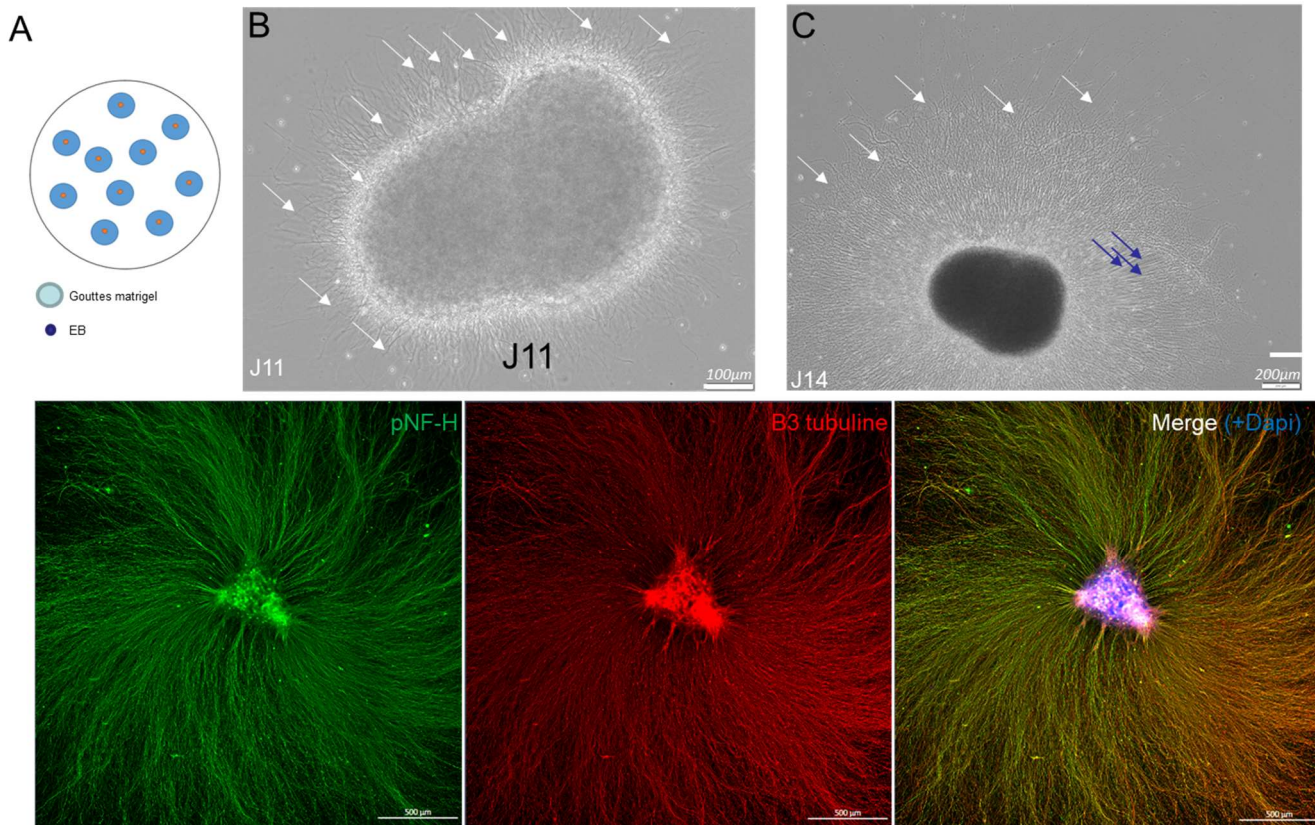


Figure 27: Obtention de motoneurones à partir d'un sphéroïde cultivé en 3D

A) Schéma du dépôt de sphéroïdes dans une boîte de pétri. B) Image d'un sphéroïde avec début de croissances axonales (flèche blanche) à J11. Grossissement $\times 10$. Barre échelle = $100\mu\text{m}$. C) Image d'un sphéroïde à J14 avec croissance axonale (flèches blanche) et prémices d'un nerf (flèches violettes). Grossissement $\times 4$. Barre échelle = $200\mu\text{m}$. D) Imagerie au microscope confocal de la culture d'un sphéroïde après marquage immunofluorescent de pNF-H (vert) et $\beta 3$ -tubuline (rouge) permettant de visualiser les axones et le marquage Dapi (bleu) qui montre les noyaux. Grossissement $\times 10$. Barre d'échelle : $200\mu\text{m}$.

2. Culture 3D des motoneurones en micro pattern

La société Axosim a développé dans des micro patterns en silicone un support de culture pour les organoïdes qui permet d'effectuer des tests de conduction nerveuse cliniquement pertinents pour mesurer les changements dans les propriétés électrophysiologiques et de réaliser des marquages sur des coupes (<https://axosim.com/nervesim/>). Grâce à la collaboration avec Lucas LEMARIE (ingénieur chez LBTI, Lyon), nous avons développé nos propres systèmes en silicone avec différentes tailles et formes.

Ce modèle est reproductible et montre une bonne croissance axonale multidirectionnelle. Afin d'améliorer le modèle, un système de micro pattern (puce en silicone) a été conçu pour favoriser la croissance axonale guidée. A partir du modèle développé par la société Axosim et les publications de Besser *et al*⁵⁰, nous avons dessiné et imprimé des moules en silicone pour se rapprocher de leurs modèles tout en s'adaptant à nos contraintes matérielles.

Différents moules ont été élaborés pour de multiples applications et formats de boîtes (annexe 3) mais seul le moule dit « cuillère » sera décrit dans ce mémoire (fig 28). Le but de ces puces est de pouvoir mesurer la croissance axonale de manière dirigée,

de développer des modèles de coculture ou bien des tests de molécules attractantes ou répulsives pour les axones.

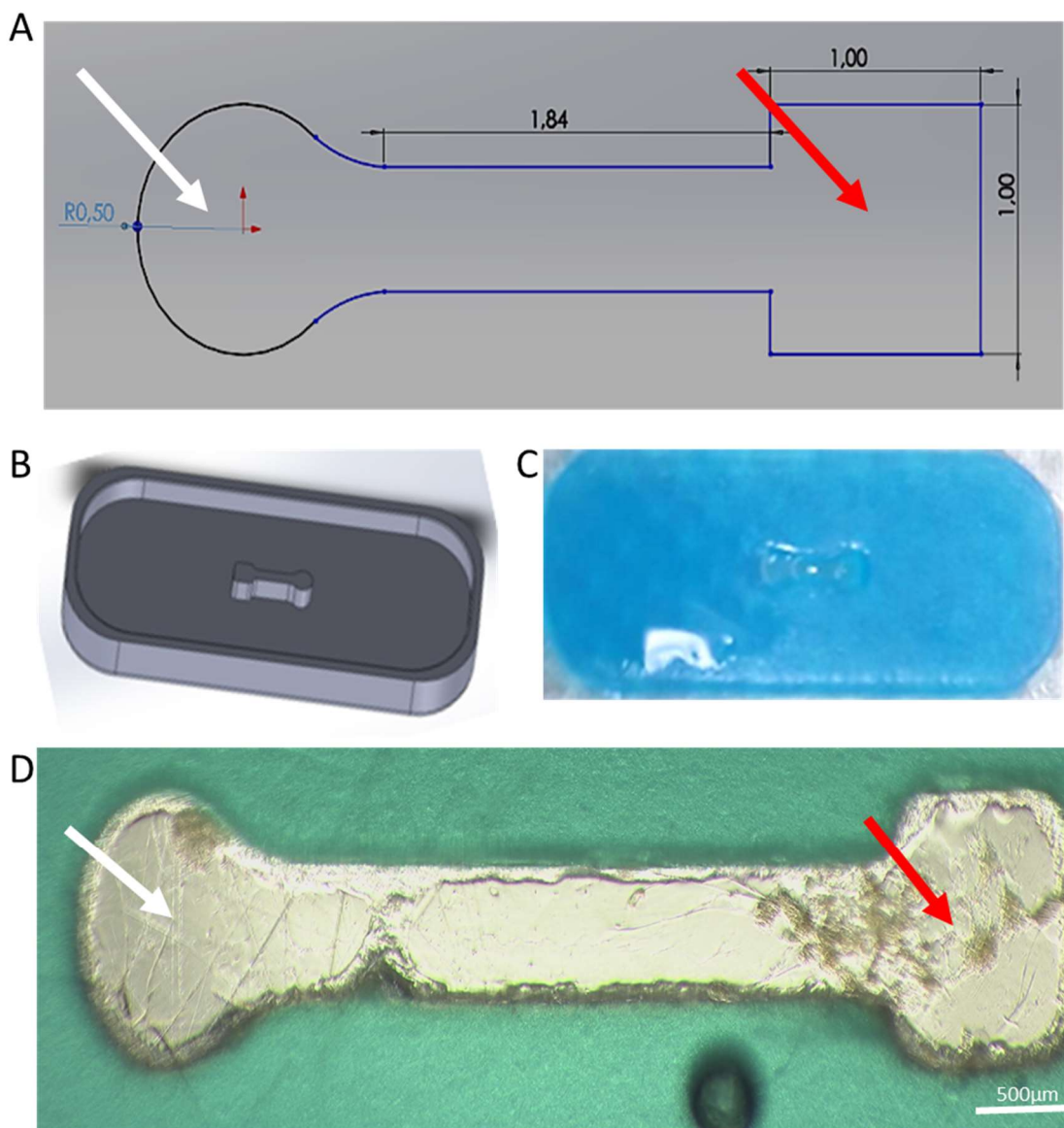


Figure 28: Modèle de moules en silicone pour culture 3D pour l'étude de la croissance axonale et/ou coculture.

A) Schéma et tailles des différents compartiments de culture (les mesures indiquées sur les schémas sont en mm). B) Moule positif imprimé pour la fabrication des puces. C) Moule silicone formé en labtek 4P. D) Photographie du moule au macrolite avec un compartiment pour un sphéroïde de motoneurones (flèche blanche) et compartiment pour les myotubes (flèche rouge). Barre échelle : 500µm

Pour la puce de la figure 29, de la même manière que la culture 3D présentée ci-dessus, un sphéroïde de progéniteurs à J9 va être placé au niveau du compartiment rond à l'extrémité de la puce, inclus dans du Matrigel dilué au demi dans du milieu MNB. Après polymérisation, le canal est rempli avec un mélange Matrigel/MNBJ9 ratio 1:1 puis mis à polymériser. Le milieu MNBJ9 est ajouté par-dessus et le changement de milieu est réalisé comme pour le protocole de culture 2D de motoneurones.

Les cellules du sphéroïde vont pouvoir se différencier en motoneurones et former le réseau axonal. Ces axones vont se développer et se répartir dans le canal, contraints par sa forme et permettant de mesurer la croissance axonale (fig 29B).

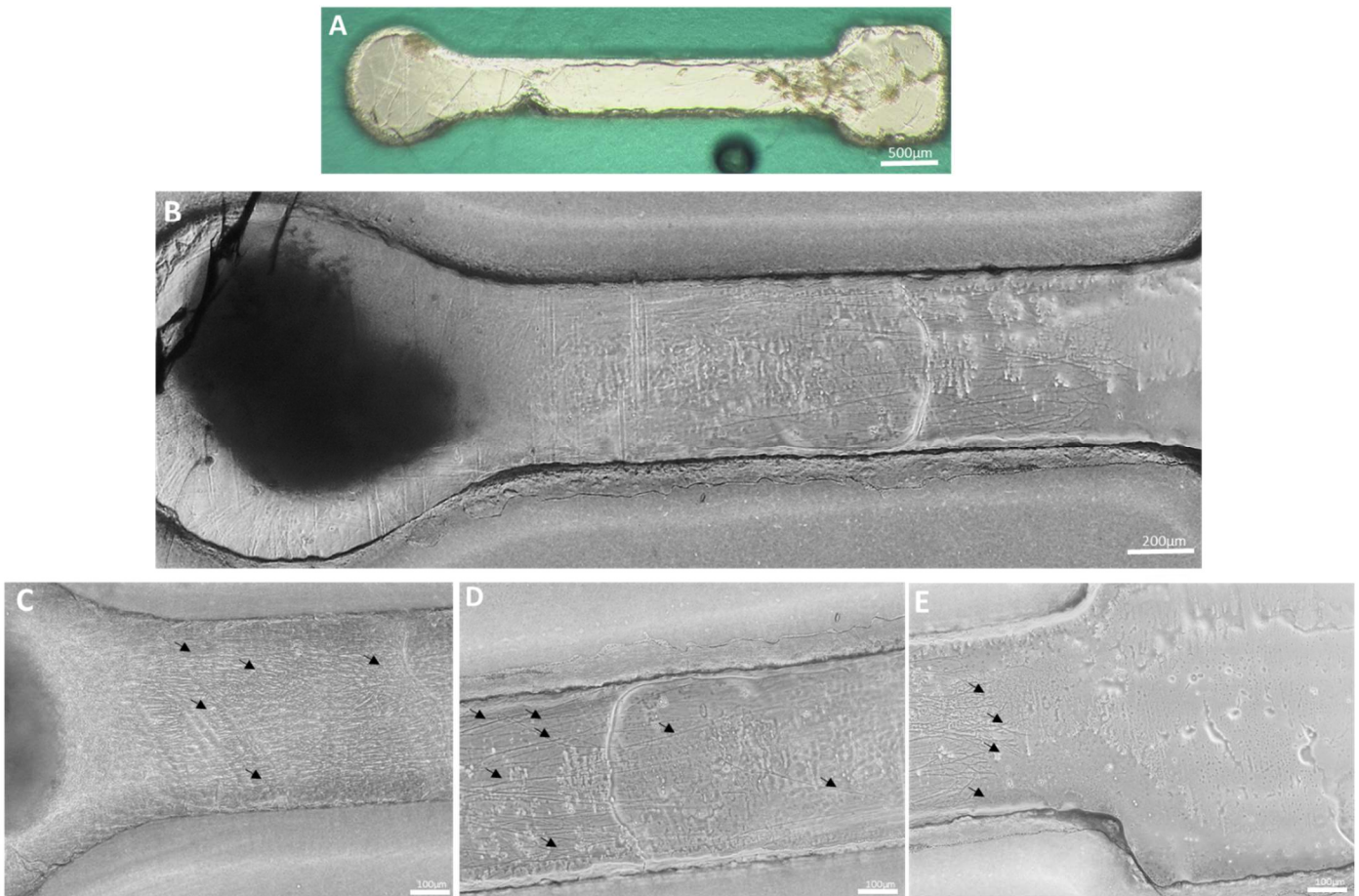


Figure 29: Image par microscopie optique des croissances axonales dans la puce silicone au jour 16 de différenciation.

Les flèches noires montrent les axones qui poussent de manière unidirectionnelle. A) Photographie de la puce silicone en « cuillère » au macrolite barre d'échelle 500µm. B) Visualisation de la taille des axones complets à partir du sphéroïdes (partie gauche) au microscope optique grossissement x4 barre d'échelle :200µm. C) Image du compartiment de dépôt du sphéroïdes et visualisation des axones ; D) image des axones dans le canal entre les deux compartiments. E) Terminaisons axonales à l'entrée du compartiment terminal. C) D) E) Microscopie optique Grossissement x10 barre d'échelle 100µm.

Il est possible de réaliser des marquages en immunofluorescence directement dans les puces pour suivre la croissance ou visualiser des organites ou des protéines. Il est également envisageable de faire de la vidéo-microscopie (*time laps*) dans ces puces (fig 29A) pour suivre le transport axonal antérograde ou rétrograde.

Dans la puce de la figure 30, un marquage en immunofluorescence a été effectué et imagé au confocal. Le marquage du DAPI (bleu) permet de localiser les corps cellulaires grâce au noyau. Le marquage de NF-H phosphorylée est représenté en vert montrant les axones. En rouge, le marquage de la *Choline Acétyl Transférase* (ChAT) qui est synthétisée au niveau du corps cellulaire et transportée au niveau des synapses dans les motoneurones matures (fig 30C). La présence de ChAT dans les motoneurones permet de montrer la maturité des motoneurones. En effet, Maury *et*

*al*⁴⁶ utilisent ce marqueur pour prouver la maturité des motoneurones à J24. Il est important de noter que les images de la figure 30 ont été faites à J18 et que le marqueur ChAT est déjà présent au niveau des synapses et colocalisé avec la protéine NF-H (couleur jaune dans la figure 24B).

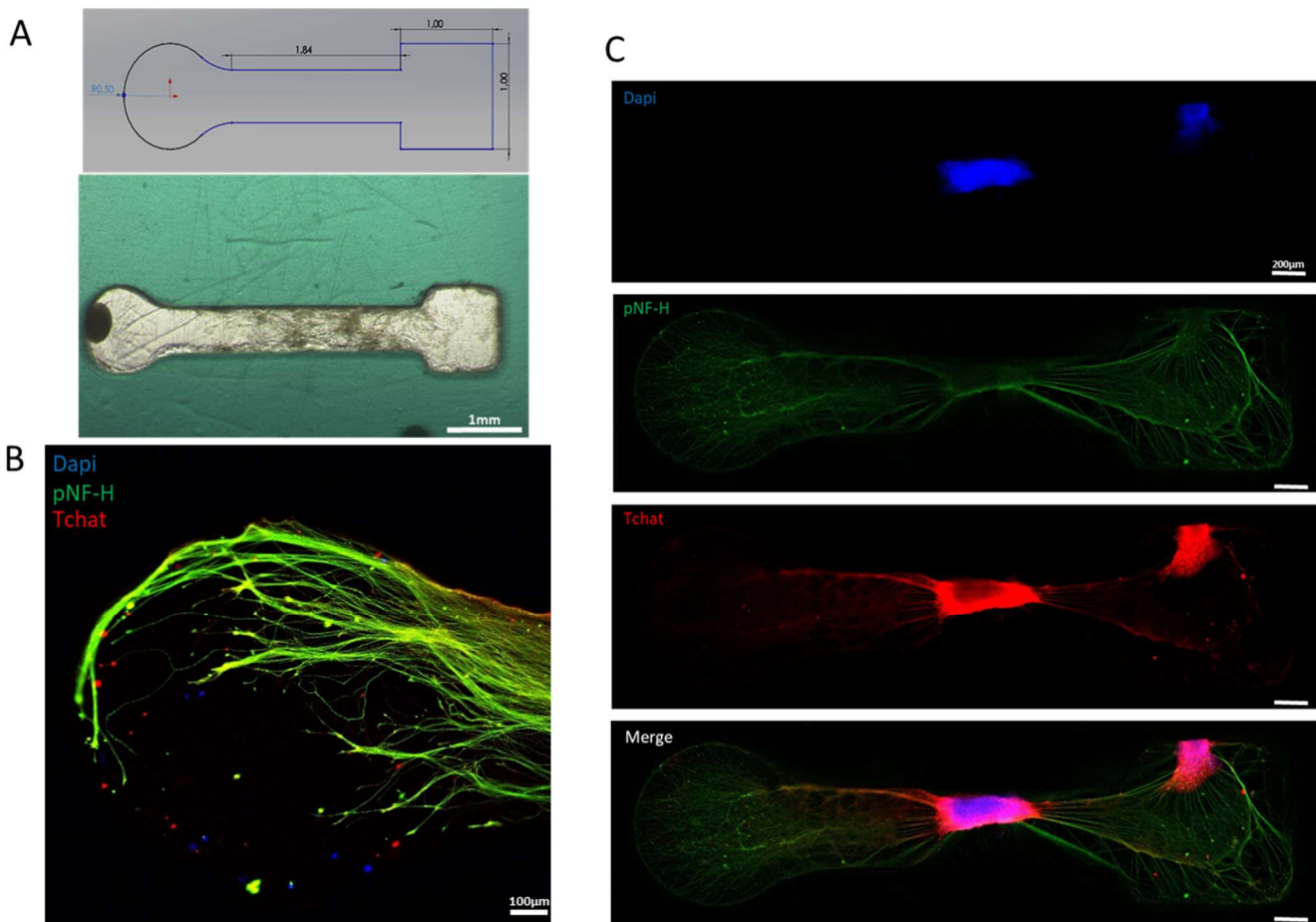


Figure 30: Croissance axonale des motoneurones dans un moule en silicone.

A) Schéma du moule silicone et photographie prise au macrolite. B) Imagerie confocale en tile scan de marquage d'immunofluorescence des terminaisons axonales de motoneurones à J18 de différenciation, marquées avec pNF-H (vert) et Tchat (rouge) grossissement x20 barre d'échelle : 100µm. C) Tile scan de marquage en immunofluorescence du moule entier avec des motoneurones à J18 de différenciation barre d'échelle : 200µm.

Ce modèle semble permettre une différenciation des progéniteurs en motoneurones matures de façon accélérée. En effet, la maturation des motoneurones apparaît déjà après 18 jours de différenciation au lieu des 25 jours comme décrits par Maury *et al* en 2015. Pour documenter plus précisément cet effet, nous pourrions analyser l'évolution de ces marqueurs en culture 2D ou 3D à différents jours de culture.

Ce modèle permet également de mieux compartimenter les corps cellulaires. Ce qui permet une meilleure visualisation des terminaisons axonales qui pourrait être intéressant pour des projets nécessitant de déposer des types cellulaires dans plusieurs compartiments et d'observer leurs interactions sans utiliser des puces microfluidiques.

3. Co culture

Pour se rapprocher plus encore de la situation *in vivo*, il est intéressant de développer des modèles de co-cultures avec les motoneurones. Ce type de modèles pourrait permettre de travailler par exemple sur des pathologies de la jonction neuromusculaire comme la détection d'autoanticorps ou bien sur la compréhension des interactions inter cellules dans l'aggravation de pathologie.

Un autre modèle intéressant concernant les pathologies neurodégénératives serait de créer une co culture avec des cellules de Schwann. Les motoneurones sont myélinisés par ces cellules pour améliorer la conduction nerveuse, ce qui modifie la structure et la physiologie des motoneurones.

a) Co culture de cellules de Schwann et de motoneurones

Pour ce travail, j'ai travaillé avec les cellules de Schwann murines (lignée S16, ATCC). Dans un premier temps, j'ai testé si les cellules S16 pouvaient être cultivées avec le milieu spécifique des motoneurones. Le passage dans le milieu MNB n'a pas provoqué de mort cellulaire et les cellules ont bien adhéré et ont continué à proliférer. J'ai donc pu réaliser des cocultures en 2D avec les motoneurones générés avec le protocole précédemment décrit. J'aiensemencé les progéniteurs de motoneurones dissociés à J9 avec les cellules de Schwann. Les deux types cellulaires ont adhéré au support de manière homogène. Les progéniteurs se sont différenciés en motoneurones matures et les S16 ont proliféré, formant par endroit un tapis confluent. Certaines S16 ont changé d'aspects formant des prolongements (fig 31C et D). En microscopie, on remarque que certains de ces prolongements ont tendance à se rapprocher des axones des motoneurones. Il est difficile de visualiser la formation de la gaine de myéline avec ces images et il faudra réaliser un marquage en immunofluorescence avec des anticorps spécifiques des cellules de Schwann (protéine S100) et un marqueur des motoneurones (β 3-tubuline ou NEF-H) pour visualiser si l'axone et les prolongements des S16 sont en interaction (fig 31D). Au jour 52 de co culture, des structures réfringentes au-dessus des corps cellulaires des motoneurones (fig 31E) se forment. Ces structures pourraient être de la myéline synthétisée par les cellules de Schwann n'arrivant pas à myéliniser l'axone. Un marquage de la myéline en immunofluorescence serait nécessaire pour valider cette hypothèse.

Cependant deux problèmes se posent : la division cellulaire des cellules S16 et la synchronisation des cultures. En effet, la lignée S16 est dérivée d'une culture primaire de cellules de Schwann immortalisée par des passages successifs et elles se divisent activement jusqu'à former un tapis. Un tapis cellulaire compliquera la visualisation de la myélinisation (si elle a lieu) et pourrait à terme provoquer le décollement de toutes les cellules, tout en consommant la plupart des nutriments du milieu.

De plus, il faut trouver la bonne fenêtre temporelle dans l'ajout de la lignée de cellule de Schwann. En effet, il serait intéressant de déposer les cellules S16 sur des motoneurones à J14 pour que les axones soient déjà formés. Les cellules S16 auraient

plus de facilité à trouver une cible à myéliniser et ainsi perdre leur caractère prolifératif. L'utilisation de 5FdU serait également possible pour éliminer toutes les cellules prolifératives et ainsi garder une population de motoneurones et Schwann capable d'interagir.

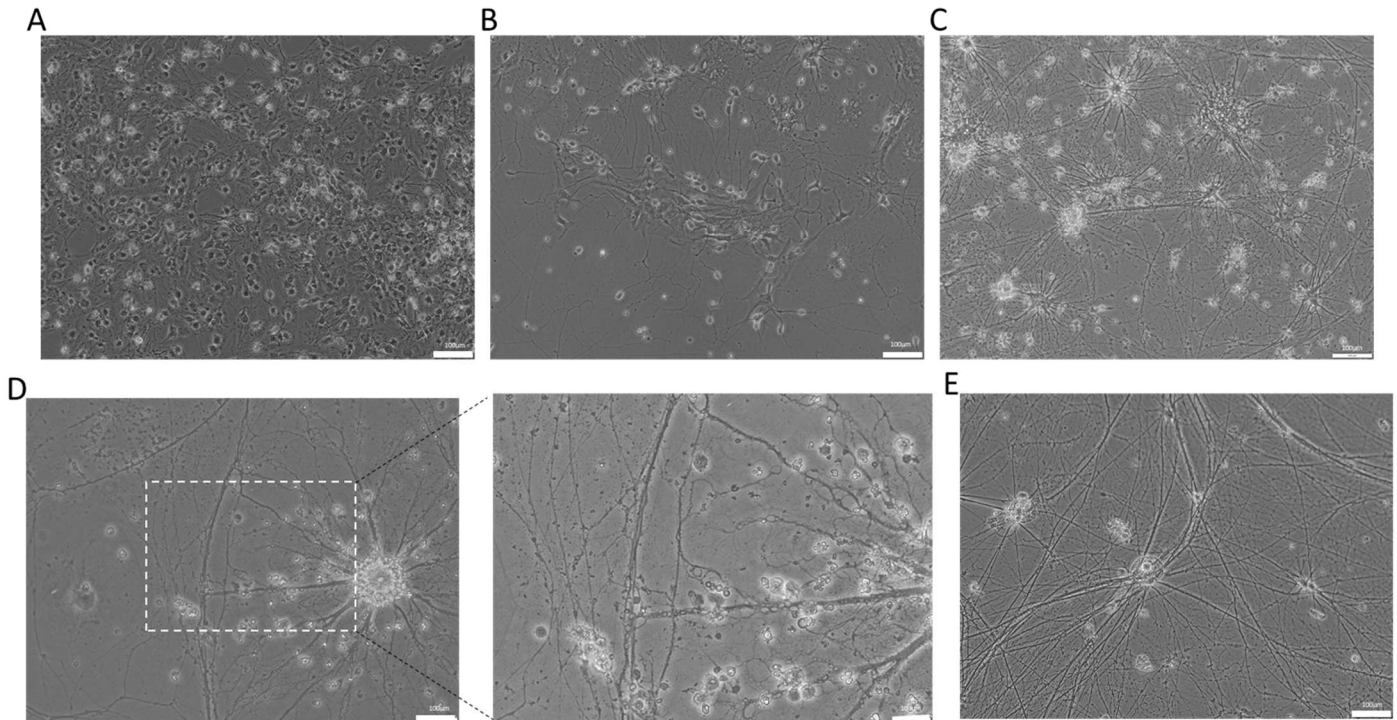


Figure 31 : Image en microscopie optique de cocultures de cellules de Schwann et de motoneurones en 2D.

A) Cellules de Schwann avant coculture. B) Coculture cellules Schwann et motoneurones (J14). C) Coculture cellules Schwann et motoneurones (J25). D) Visualisation d'interaction potentielle entre la cellule de Schwann et les axones des motoneurones (gauche : grossissement x20 et droite : x40). E) Coculture cellules de Schwann et motoneurones avec formation de gouttes réfringentes au-dessus des corps cellulaires de MN (flèche blanche) (J52) grossissement x20. Images A, B, C, D : les flèches rouges montrent les cellules de Schwann et les flèches bleues les motoneurones.

b) Co- culture motoneurones et myoblastes

Concernant les essais de co culture de motoneurones et de myoblastes que j'ai réalisés, les deux types cellulaires ont été mis en culture simultanément en support 2D (puits Ibidi ou boîtes de Pétri). Les progéniteurs de motoneurones sont dissociés au jour 9 et comptés. Les myoblastes sont décollés et comptés également. La densité cellulaireensemencée de chaque type cellulaire doit être adaptée. En effet, pour obtenir des myotubes, la densité en myoblastes doit être importante pour qu'ils fusionnent (40 000cellules/cm²). Pour les motoneurones, la concentration cellulaire doit être de 25 000 cellules par cm². Par exemple, dans les Ibidi 4 puits, la surface de culture est de 1.9cm². J'ai donc déposé 50 000 progéniteurs de motoneurones et 80 000 myoblastes par puits.

Les cellules sont mises en culture en milieu MNB (spécifique du motoneurone). Des tests de différenciation des myoblastes en myotubes ont été effectués et ont montré de bons résultats.

Comme le montre la figure 32A, les deux types cellulaires sont compatibles en culture 2D avec une bonne survie des myoblastes dans le milieu des MN et le développement d'axone pour les MN. De plus, la co culture des myoblastes avec les motoneurones semble améliorer la différenciation des myoblastes en myotubes. Reste à déterminer si c'est la présence des MN ou la composition du milieu de culture des MN qui favorise la formation des myotubes. Il faudra également mesurer les index de fusion (correspondant au nombre de noyaux par myotube et donc au nombre de myoblastes ayant fusionné par myotube) à différents temps de culture dans les co cultures et dans les monocultures avec les deux types de milieux de culture.

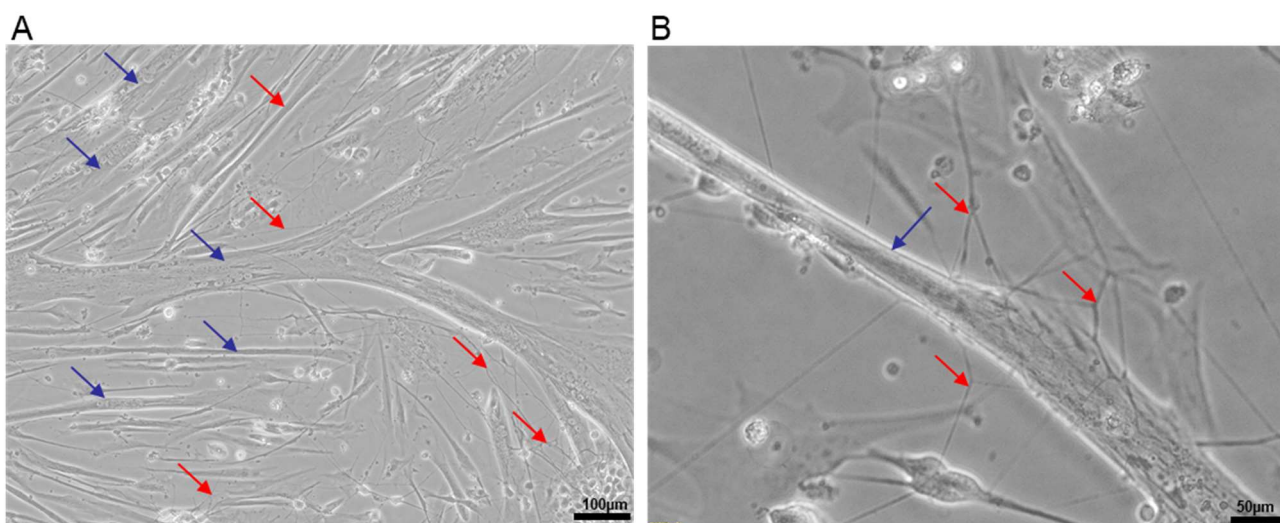


Figure 32: Imagerie de la coculture Myoblastes/Mn à J16 de différenciation des MN avec fusion des myoblastes en myotubes.

A) Coculture 2D avec formation de myotubes et motoneurones en développement. Grossissement x10 barre échelle : 100µm ; B) Possible interaction des axones avec les myotubes. Grossissement x40 barre échelle : 100µm. Visualisation des Myotubes par les flèches bleues et les motoneurones avec les flèches rouges.

Grâce aux résultats encourageant des co cultures en 2D, la co culture 3D a été initiée dans les puces « cuillère » (fig 33A). Pour ce faire, un sphéroïde de motoneurones à J9 a été isolé et placé dans l'emplacement prévu dans du matrigel dilué au ½ dans du milieu MNBJ9. Les myoblastes ont été décollés de leur boîte de culture à l'aide de solution enzymatique et comptés à la cellule de malassey. Dans le compartiment des myoblastes de la puce (zone carrée de la puce silicone), 4000 myoblastes (soit 40 000 cellules/cm²) ont été déposés dans du matrigel dilué au ½ dans du milieu MNBJ9. La puce a été placée à 37°C pour la polymérisation du matrigel durant 30 min. Après polymérisation, le canal reliant les deux compartiments a été rempli avec du matrigel dilué au ½ avec du MNBJ9 et mis à polymériser à son tour 30 minutes à 37°C. Enfin, du milieu MNBJ9 a été ajouté par-dessus.

La croissance des axones et la différenciation des myoblastes a été observé tous les deux jours avant le changement de milieu (en suivant le protocole de différenciation des motoneurones). A J18, les axones ont atteint les myotubes formés. Après fixation, un immunomarquage a été effectué en marquant les protéines NF-M (spécifiques des motoneurones), protéine *myosin heavy Chain* (MF20 spécifique des myotubes) et en utilisant l' α -bungarotoxine fluorescente pour distinguer les jonctions neuromusculaires (fig 33B-C).

Les images de microscopie à fluorescence et au microscope confocal présentées en figure 33B-C montrent la présence de récepteurs de l'acétylcholine au niveau de la connexion entre certains MN et des myotubes, attestant de la formation de jonction neuromusculaires.

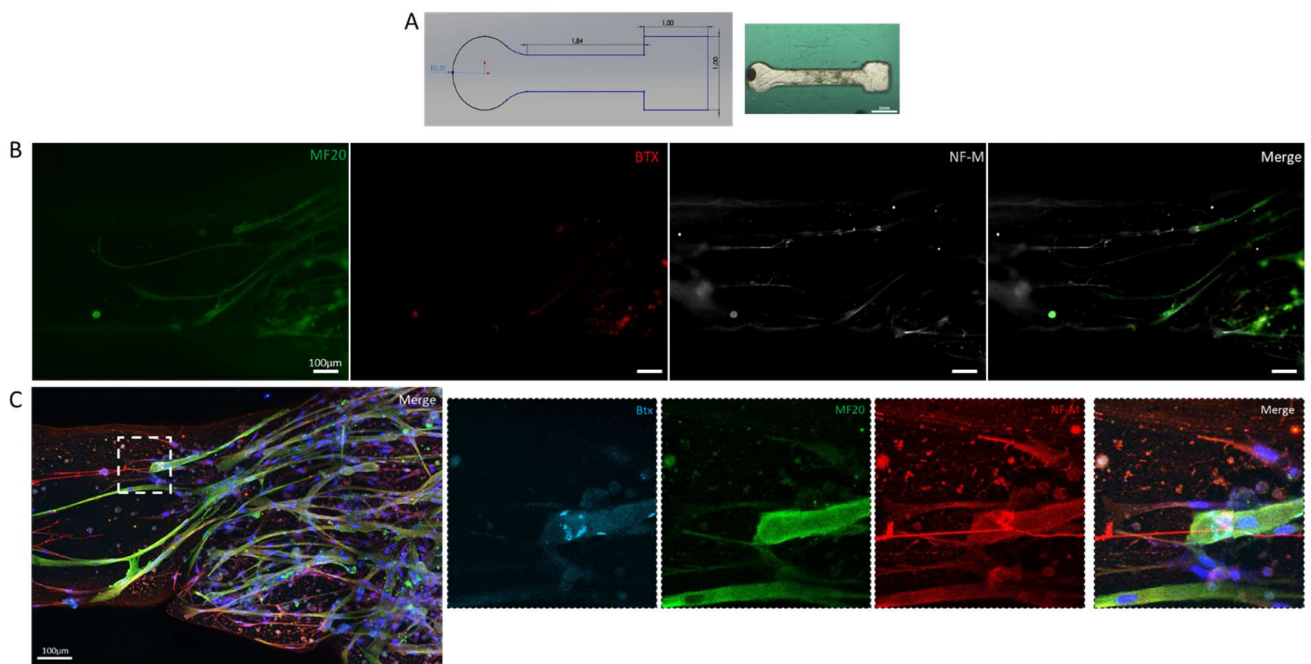


Figure 33: Résultats des marquages en immunofluorescence de coculture motoneurones et myoblastes dans les puces silicones après 9 jours de coculture.

A) Schéma et image au macrolite de la puce utilisée pour la coculture. B) Imagerie à l'EVOS de la coculture après immunomarquages de MF20 (en vert) permettant de visualiser les myotubes, NF-M (en gris) permettant de visualiser les axones des motoneurones et α bungarotoxine en rouge permettant de visualiser les récepteurs d'acétylcholine (jonction neuro musculaire). Grossissement x20

B. Application du modèle avec le projet CMT2CC

Le projet Myopharm NF-H financé par l'Association Française contre les Myopathies (AFM) consiste à étudier 2 variants du gène *Neurofilament heavy Chain* (NF-H) impliqués dans une CMT de type 2. Ces 2 variants ont été découverts par séquençage haut débit (NGS) et ont permis de décrire une nouvelle forme axonale de la pathologie CMT, la forme CMT2cc^{3,4,30}.

a. Cas clinique :

La CMT de type 2cc (OMIM 616924) est une maladie rare liée à des mutations du gène NF-H avec seulement 8 familles identifiées dans le monde à ce jour^{3,4,30}. Parmi elles, 2 familles sont françaises (fig 34). La famille n°1 est jusqu'à présent la plus grande famille décrite au monde affectée par la mutation héritée NF-H c.3008_3009delAA. La famille n°2 compte un seul patient affecté par la mutation *de novo* NF-H c.3043_3044delAA.

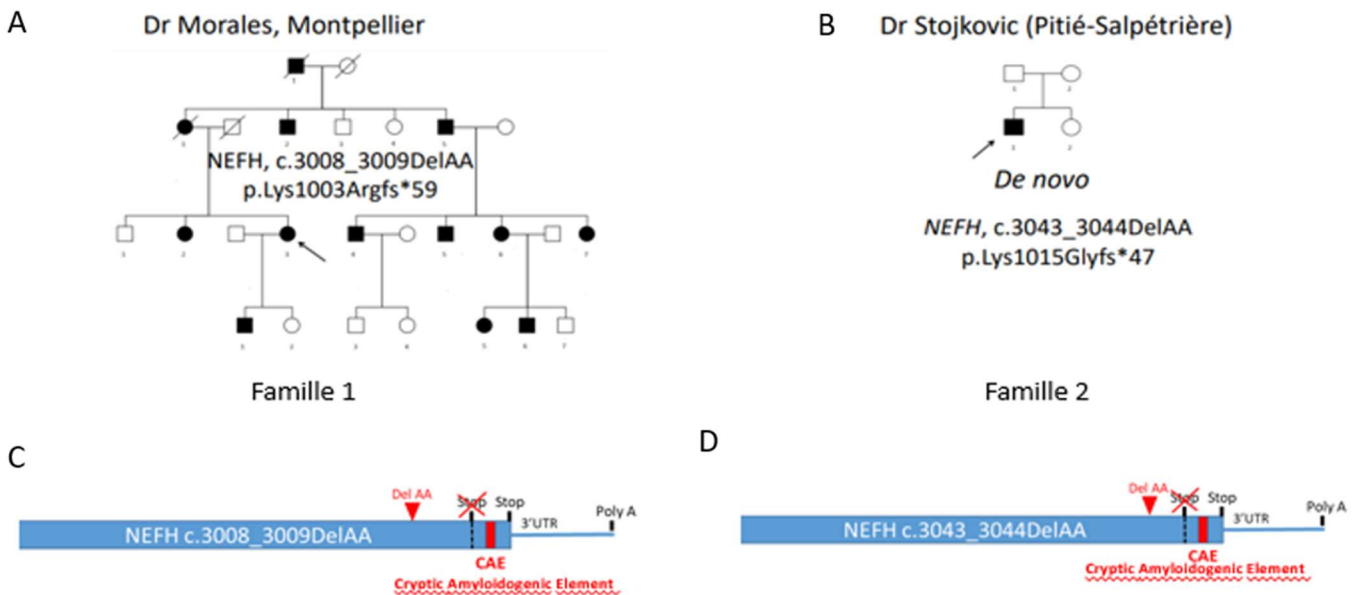


Figure 34: Pedigree des deux familles.

A) Famille 1. B) Famille 2. La flèche indique le patient suivi. Les lignes obliques indiquent les individus décédés. Les carrés représentent les hommes et les cercles les femmes. Les symboles pleins représentent les sujets atteints. C) et D) mutation NEFH c.3008_3009delAA du gène NEFH de la famille 1 (C) et mutation c.3043_3044delAA de la famille 2 (D) provoquant la traduction de 40aa supplémentaires. Les deux mutations provoquent la suppression du codon stop ajoutant 40 acides aminés contenant un élément amyloïdogène cryptique (CAE).

b. Données préliminaires à l'étude

Les deux mutations ont été publiées par le laboratoire en 2017⁴. La surexpression du gène muté dans des cellules SH-EP (lignée cellulaire issues de neuroblastome humain) induit l'agrégation des protéines NF-H mutées dans la région périnucléaire⁴. Ces agrégats colocalisent avec des marqueurs de l'autophagie telles que la polyubiquitine, la protéine adaptatrice P62 et la protéine de l'autophagosome LC3b. Cette colocalisation souligne que la cellule reconnaît activement les protéines NF-H mal conformées et les envoie dans la voie d'autophagie pour les dégrader. Mais la surexpression de ces gènes mutés est aussi associée à l'activation de la caspase3 traduisant l'induction de l'apoptose et suggérant que l'activation de l'autophagie n'est pas suffisante pour dégrader les protéines mal conformées dont l'accumulation finit par être toxique. De même, la surexpression des formes mutées de NF-H dans les motoneurones primaires d'embryon de souris ou *in vivo* dans les motoneurones d'embryons de poulet montre un résultat similaire⁴ : une accumulation d'agrégats périnucléaires colocalisés avec des marqueurs d'autophagie et une induction de l'apoptose.

Ces données permettent d'orienter nos recherches vers la recherche d'agrégats NF-H axonaux ou périnucléaires dans les motoneurones des patients dérivés de cellules souches. Contrairement aux expériences de surexpression, avec cette approche, le niveau d'expression du gène muté dans les motoneurones de patients sera endogène ce qui peut rendre la recherche d'un phénotype ou de la voie pathophysiologique difficile mais *in fine* plus pertinente. En effet, une pathologie qui a mis plusieurs décennies pour s'exprimer chez un patient va-t-elle s'exprimer dans des motoneurones *in vitro* de quelques semaines ?

c. Matériels cellulaires

Dans le cadre de ce projet, les fibroblastes des deux familles ont été échantillonnés (lignées Z019F01 provenant du patient de la famille 2 et la lignée 5-7720 provenant de la famille 1) et ont été mis en banque au Centre de Biotechnologie Cellulaire (CBC Biotec) aux Hospices Civils de Lyon ou au Généthon à Evry. Des contrôles qualité tels que contaminations bactériologiques, profil génétique par STR (en anglais *Short Tandem Repeat*) et caryotypes ont été réalisés par la plateforme iPS de l'Institut NeuroMyoGène (INMG).

Ensuite, les fibroblastes des patients ont été envoyés à différentes plateformes pour générer des cellules iPS. La plateforme académique de Nantes, dirigée par le Dr Laurent DAVID, a reprogrammé les fibroblastes 5-7720 et la lignée a été rebaptisée « NF-H CAE3 ». C'est la première lignée « patient » qui fut disponible pour lancer les études.

En parallèle et à la demande de l'AFM, les fibroblastes Z019F01 et 5-7720 ont été adressés à la société Phenocell pour être reprogrammés en cellules iPS afin de générer les ressources biologiques pour le projet Myopharm. Les lignées iPS PC166 et PC167 ont été établies respectivement à partir des fibroblastes Z019F01 et 5-7720. Ces deux patients sont hétérozygotes pour la mutation NF-H. Phenocell a fourni les clones de

cellules iPS de chaque lignée cellulaire à la plateforme de bioproduction d'I-Stem qui a effectué les contrôles qualité et amplifié les clones d'intérêts.

A partir de la lignée PC167, une lignée dans laquelle la mutation a été corrigée par CRISPR/Cas9 a été produite à I-Stem (lignée PC167 rescue). La société I-Stem a également produit deux lignées par CRISPR/Cas9 à partir d'une lignée contrôle (lignée PC56wt) : i) lignée hétérozygote pour la mutation (lignée PC56Htz) et ii) une lignée homozygote pour la mutation de la lignée PC167 (lignée PC56Hmz).

Au total quatre lignées contrôles ont pu être utilisées dans ce projet : les lignées PC56wt, PC196wt et PC197wt transmises par CECS/I-Stem et la lignée AG08C5 de l'INMG.

Toutes les lignées sont récapitulées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Lignées utilisées durant le projet.

| Lignées IPS utilisées pour projet Myopharm | | | | | | | | | | |
|--|----------------------|--|--------------|--------------|--------------|--|--|---|---|---|
| Lignées | AG08C5 | NEFH CAE3 | PC56wt | PC196 | PC197 | PC166 | PC167 | PC167 Rescue | PC56 Htz | PC56 Hmz |
| Cellule d'origine | Fibroblastes | Fibroblastes | Fibroblastes | Fibroblastes | Fibroblastes | Fibroblastes | Fibroblastes | Fibroblastes | Fibroblastes | Fibroblastes |
| Provenance des iPS | Plateforme marseille | Plateforme Nantes | CECS/I-STEM | CECS/I-STEM | CECS/I-STEM | CECS/I-STEM | CECS/I-STEM | CECS/I-STEM | CECS/I-STEM | CECS/I-STEM |
| Caractéristique | Temoin | Reprogrammation cellules patient famille 2 | Temoin | Temoin | Temoin | Reprogrammation cellules patient famille 1 | Reprogrammation cellules patient famille 2 | Rescue par CRISPR | Mutation par CRISPR | Mutation par CRISPR |
| Mutation | X | NEFH, c.3043_3044DelAA | X | X | X | NEFH, c.3008_3009DelAA | NEFH, c.3043_3044DelAA | NEFH, c.3043_3044DelAA corrigé par crisper cas9 | Suppression codon stop (mime mutation patients) | Suppression codon stop (mime mutation patients) |
| Statut génétique NEFH | x | Hétérozygote | x | x | x | Hétérozygote | Hétérozygote | x | Hétérozygote | Homozygote |

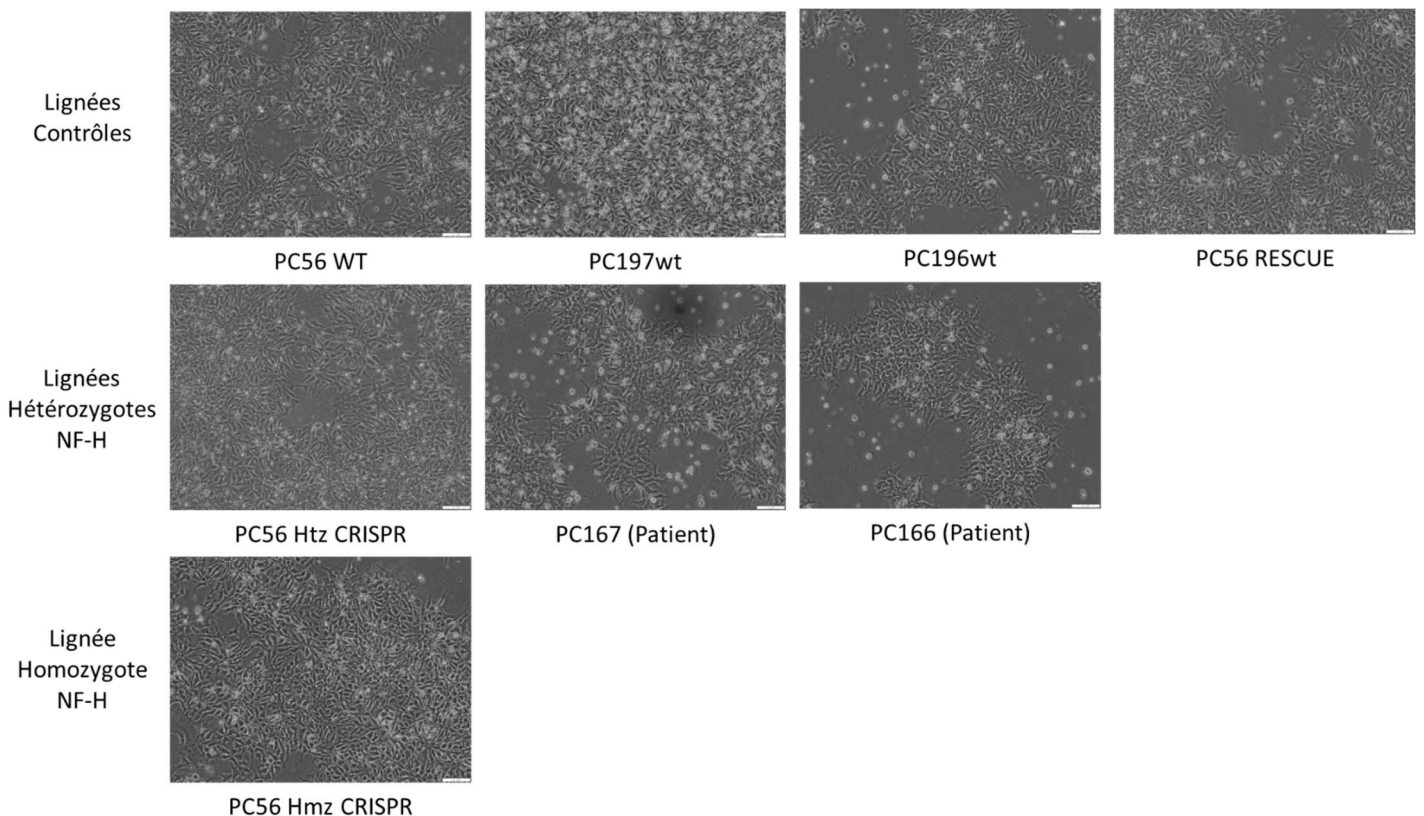
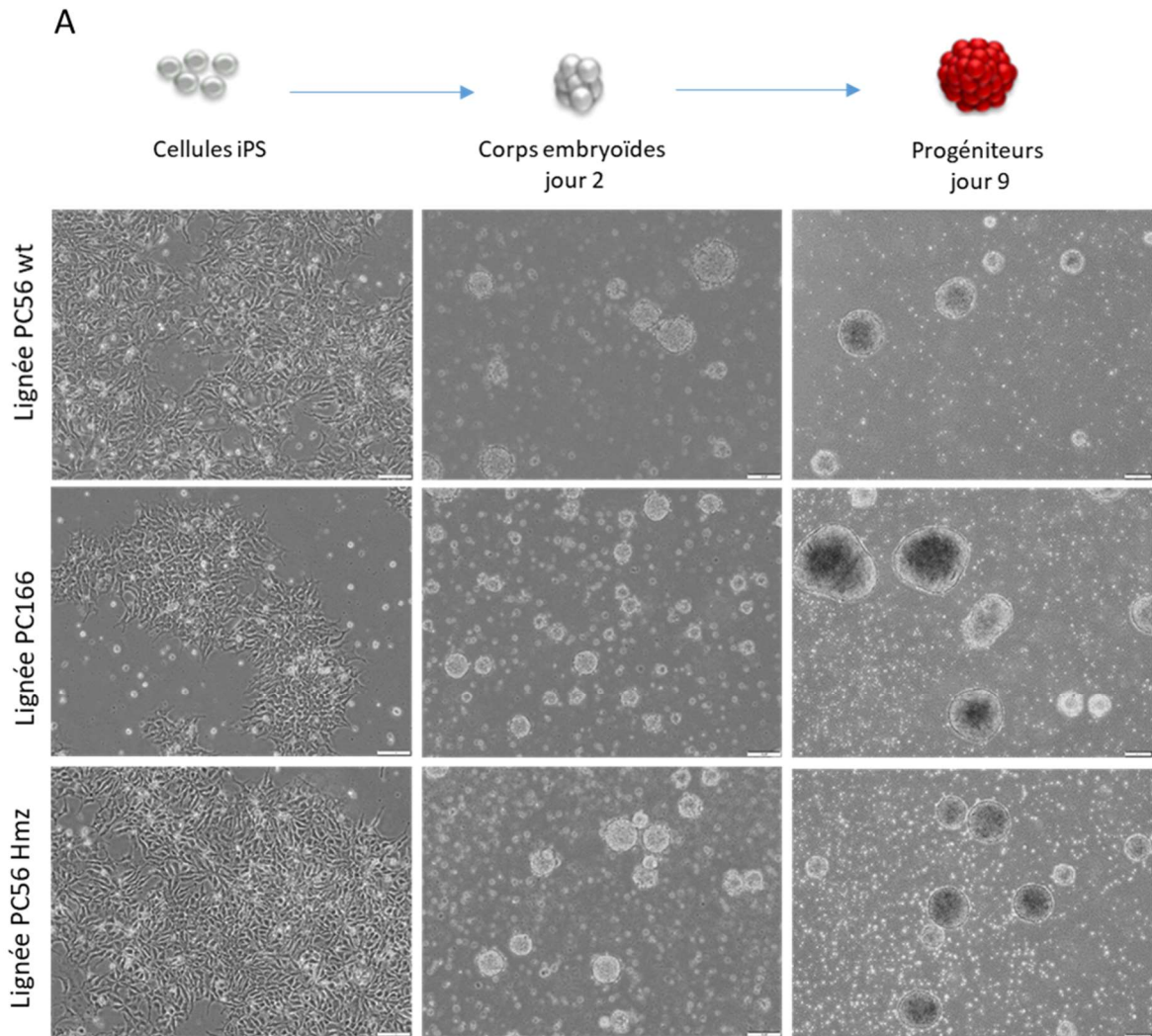


Figure 35: Imagerie en contraste de phase des cellules iPS des 8 lignées transmises par I-Stem avant différenciation.

Grossissement x10 barre d'échelle = 100µm

d. Résultats de différenciation des cellules iPS en motoneurones

Comme décrit précédemment, nous avons généré des progéniteurs neuronaux sur la base du protocole de Maury *et al*, 2015 optimisé (fig 21 et 22). La croissance cellulaire au cours de la première phase a permis d'obtenir des sphéroïdes de taille importante (fig 35) avec des disparités en fonction des lignées. Lors de la première différenciation (notée « D1 ») des 8 lignées, la lignée contrôle PC196 et la lignée de patient PC167 n'ont pas permis d'obtenir suffisamment de cellules au jour 9 pour réaliser l'ensemble des expériences programmées. Ainsi, seuls les marquages par immunofluorescences de la protéine NF-H phosphorylée (fig 39) ou non phosphorylée (fig 38) ont été réalisés. Une seconde différenciation (nommée « D2 ») a permis de différencier la lignée PC196 en parallèle de PC56wt et PC56hmz. La lignée PC167 n'a pas produit suffisamment de progéniteurs lors de cette différenciation. Les contrôles qualité en cours de différenciation ont été effectués au jour 10 (J10) et 14 (J14) pour valider l'utilisation de ces 2 lots de différenciation (résultats de la différenciation n°2 dans le tableau 4 et figure 24).



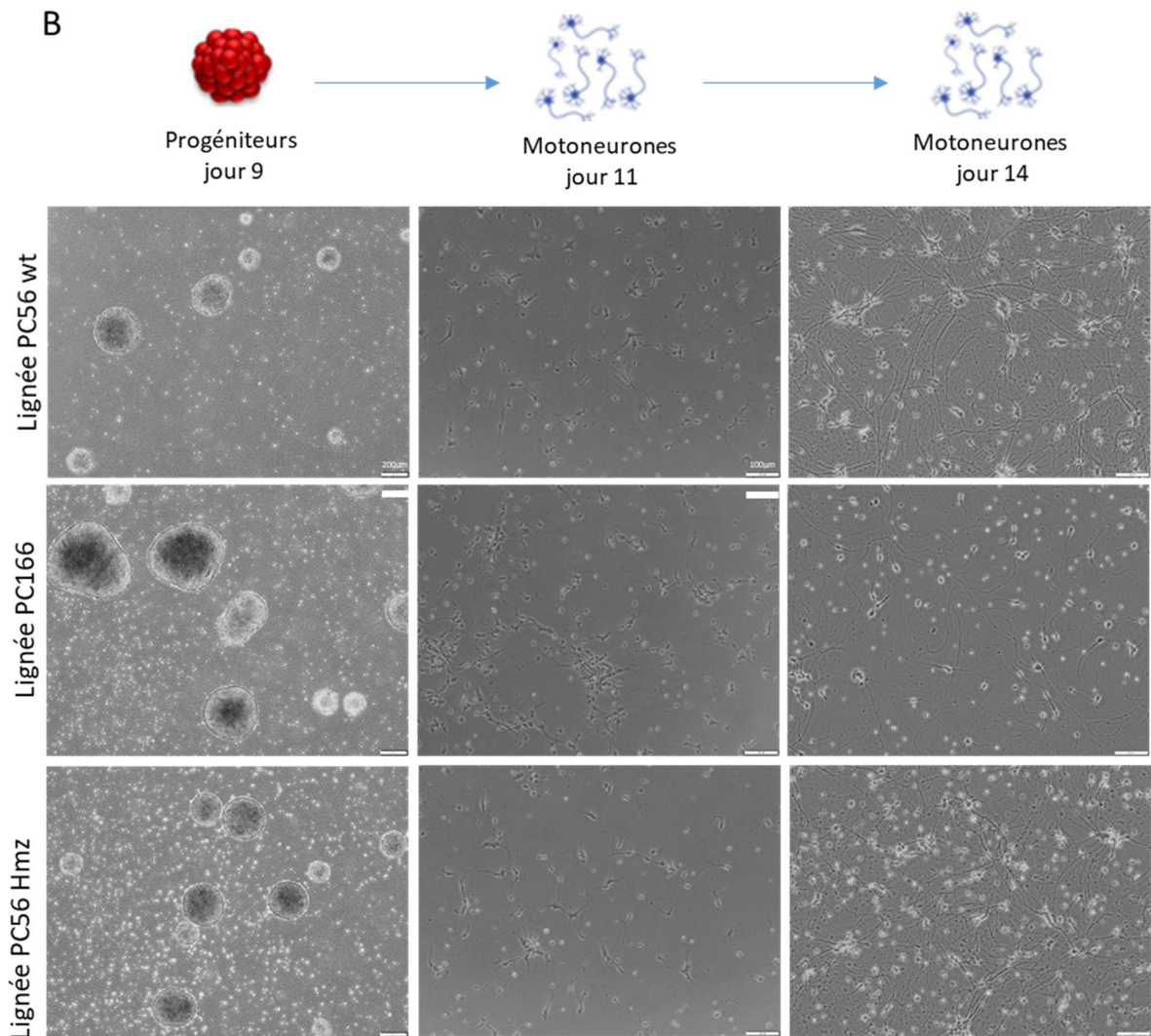


Figure 36: Exemple de différenciation de 3 lignées iPS en motoneurones : PC56wt, PC166(hétérozygote) et PC56hmz.

e. Recherche de phénotype

1. Analyse des variants par immunofluorescence

a) Anticorps anti NF-H muté

Afin de visualiser la forme mutée de la protéine NF-H, nous avons fait générer par la société ProteoGenix, un anticorps dirigé contre la forme mutée de la protéine (que nous appellerons « CAE ») en immunisant des lapins avec 3 peptides présents dans la séquence de 40 acides aminés de l'élément amyloïde cryptique de la protéine NF-H mutante. Nous avons reçu deux lots sérums provenant de deux lapins immunisés avec le peptide de 40 acides aminés, ces deux anticorps sont ainsi nommés CAE1 et CAE2.

J'ai réalisé différents marquages des motoneurons par immunofluorescence avec l'anticorps commercial anti-NF-H (Biolegend, BLE801701 clone Smi32) et les sérums de lapins immunisés CAE1 et CAE2 sur la lignée homozygote (PC56hmz), la lignée du patient de la famille 2 (PC167htz) et la lignée contrôle (PC197wt) (fig 36). Le marquage par immunofluorescence de la protéine NF-H (wt et mutée) dans les cellules du patient ou dans la lignée homozygote générée par CRISPR/Cas9 ne montre pas de différence avec la lignée « contrôle PC197wt ». Dans les images de la figure 36, l'anticorps NF-H wt (NF-H Smi32) reconnaît bien les filaments intermédiaires qui démarrent dans le corps cellulaire et se prolongent dans l'axone de manière continue et non agrégés (fig 37A-B). La protéine est exclusivement cytoplasmique et exclue du noyau des cellules. On retrouve ce type de marquages dans les deux lignées utilisées. Les deux sérums CAE1 et CAE2 dirigés contre la forme mutée de la protéine produisent un marquage différent de l'anticorps NF-H smi32 (fig 37A-B). Les cellules du patient et la lignée homozygote PC56hmz montrent un marquage discontinu, faible au niveau des axones et principalement nucléaire dans les cellules. Ceci n'est pas cohérent avec la localisation cytoplasmique attendue de la protéine NF-H. Il est possible que ces sérums reconnaissent d'autres protéines (possédant un peptide amyloïde similaire) et donne un marquage aspécifique. En effet, en comparant les deux marquages CAE1 et CAE2 avec NF-H smi32 (fig 37A-B), la colocalisation des marquages n'est que partielle pourtant l'anticorps NF-H wt smi32 reconnaît à la fois la protéine wt et la protéine mutée. Afin de nous assurer que les sérums CAE1 et CAE2 reconnaissent bien seulement la protéine mutée, nous avons transfecté des cellules HEK293T avec un plasmide de chacune des deux formes de NF-H (protéine wt ou muté) fusionnées à la GFP et réalisé des marquages avec les sérums et l'anticorps NF-H smi32. Les sérums CAE1 et CAE2 ont bien reconnu ces contrôles positifs surexprimés ce qui est attesté par la co localisation du marquage de la GFP (qui reconnaît la protéine fusionnée) avec les anticorps des sérums CAE1 et CAE2, mais aussi avec l'anticorps anti-NF-H (smi32 ; données non présentées). Il semble donc que les anticorps CAE1 et CAE2 ne permettent pas de visualiser la protéine endogène mutée en immunofluorescence soit parce que le rapport signal sur bruit n'est pas favorable, soit parce que la protéine mutée est faiblement exprimée ou ne s'accumule pas à ce stade.

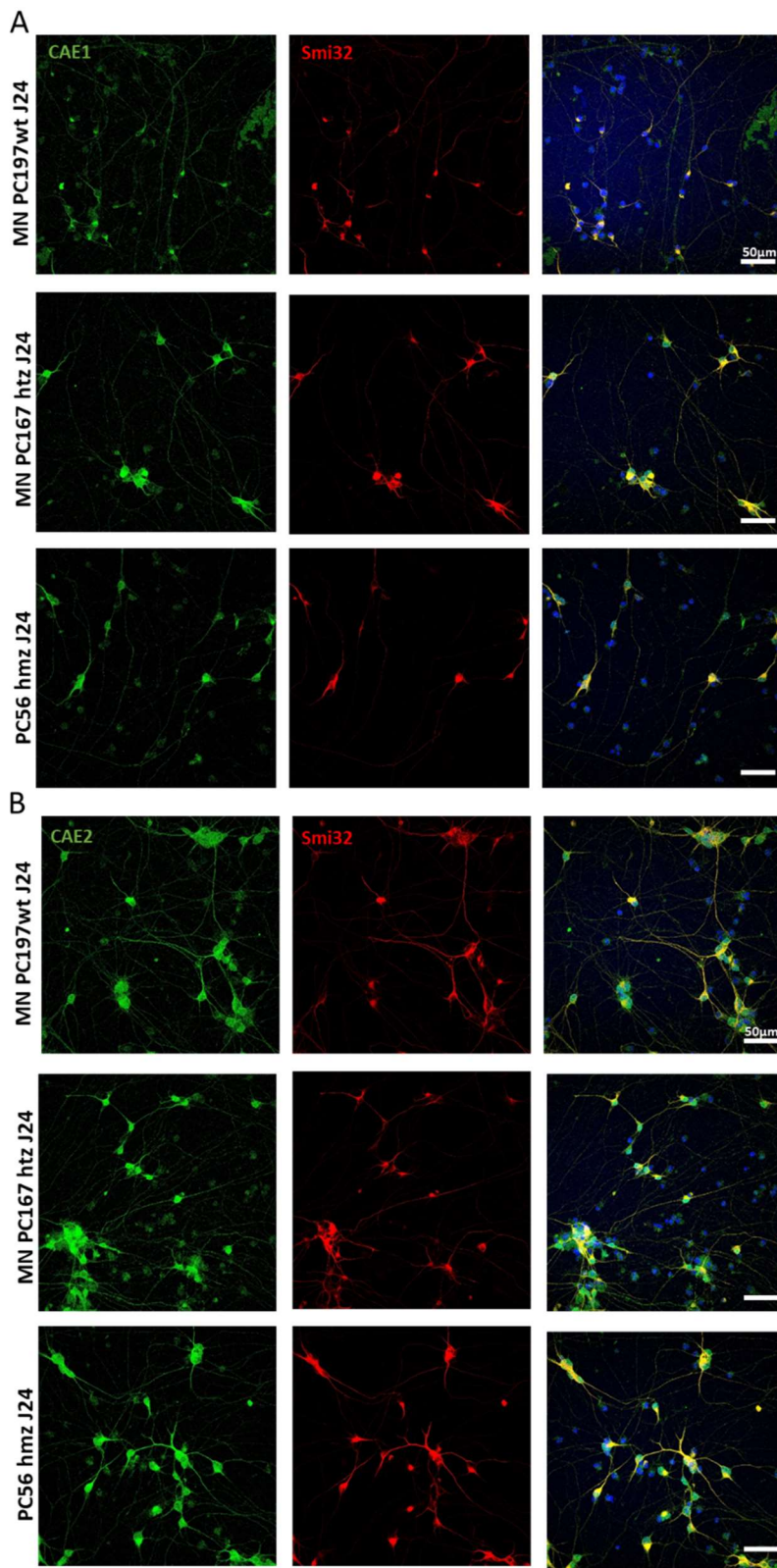


Figure 37: Immunofluorescence des motoneurones de la lignée homozygote (PC56 hmz), la lignée du patient de la famille 2 (PC167htz) et la lignée contrôle (PC197wt) à 24 jours de différenciation

A) Utilisation de l'anticorps CAE1 anti-NF-H spécifique de la forme mutée motoneurones (rouge) et l'anticorps Smi32 reconnaissant de la forme wt (vert) ont été utilisés. B) Utilisation de l'anticorps CAE2 anti-NF-H spécifique de la forme mutée motoneurones (rouge) et de la forme wt (vert) ont été utilisés. Les noyaux ont été marqués avec du DAPI. Imagerie confocal LSM880. Grossissement x40. Barre d'échelle : 50µm

b) Marquage NF-H /lignées

Les neurofilaments sont des protéines de grande taille et abondamment phosphorylées. Ils portent de nombreux sites de phosphorylation (jusqu'à 100 dans certains cas), organisés en motifs répétés (motif KSP). NF-H est le neurofilament qui possède le plus de motifs KSP^{35,36,51}. La phosphorylation intervenant de manière post traductionnelle, l'ajout des 40 acides aminés dans les cellules possédant la mutation pourrait modifier la phosphorylation de NF-H et il est donc intéressant d'évaluer si la phosphorylation de la protéine est modifiée par les mutations des patients.

Le marquage de la forme non phosphorylée est réalisé avec l'anticorps NF-H smi32, alors que la protéine phosphorylée pNF-H est reconnue par l'anticorps NF-H Smi31. Ces deux anticorps sont d'origine murine et ne peuvent donc pas être utilisés simultanément. Grâce à ces marquages, on pourrait mettre en évidence une différence de localisation et/ou de quantité relative de protéines NF-H et pNF-H.

Les images obtenues au microscope confocal ne montrent pas de différence de marquage entre les cellules contrôles et les cellules des patients ou bien l'homozygote généré par CRISPR/Cas9. En effet, le marquage avec l'anticorps NF-H smi32 se trouve principalement au niveau du corps cellulaire et le marquage s'éteint progressivement dans les axones (fig 38 et 40). Au contraire, le marquage avec pNF-H (smi31) se situe préférentiellement dans les axones et non dans les corps cellulaires où l'on retrouve un faible marquage (39 et 40) pour toutes les lignées cellulaires. La formation d'agrégats n'est pas visible au niveau des corps cellulaires dans les motoneurons à 24 jours de différenciation comme le montrent les images des figures 40 et 41 prises à un grossissement 63X. En effet, les corps cellulaires sont imagés avec un marquage immunofluorescent de la protéine NF-H (représenté en vert) et de la β 3 tubuline en rouge (microtubules spécifiques des motoneurons représentés en rouge). Entre les lignées contrôles (PC196, PC197, PC56wt) et les lignées mutés hétérozygotes (PC56htz et PC166) ou lignée homozygote (PC56hmz), il n'y a pas de différence d'intensité de signal pour le marquage de NF-H. Il n'est pas possible non plus de visualiser d'agrégat de la protéine au niveau péri-nucléaire ou dans le début des axones (fig 40 et 41).

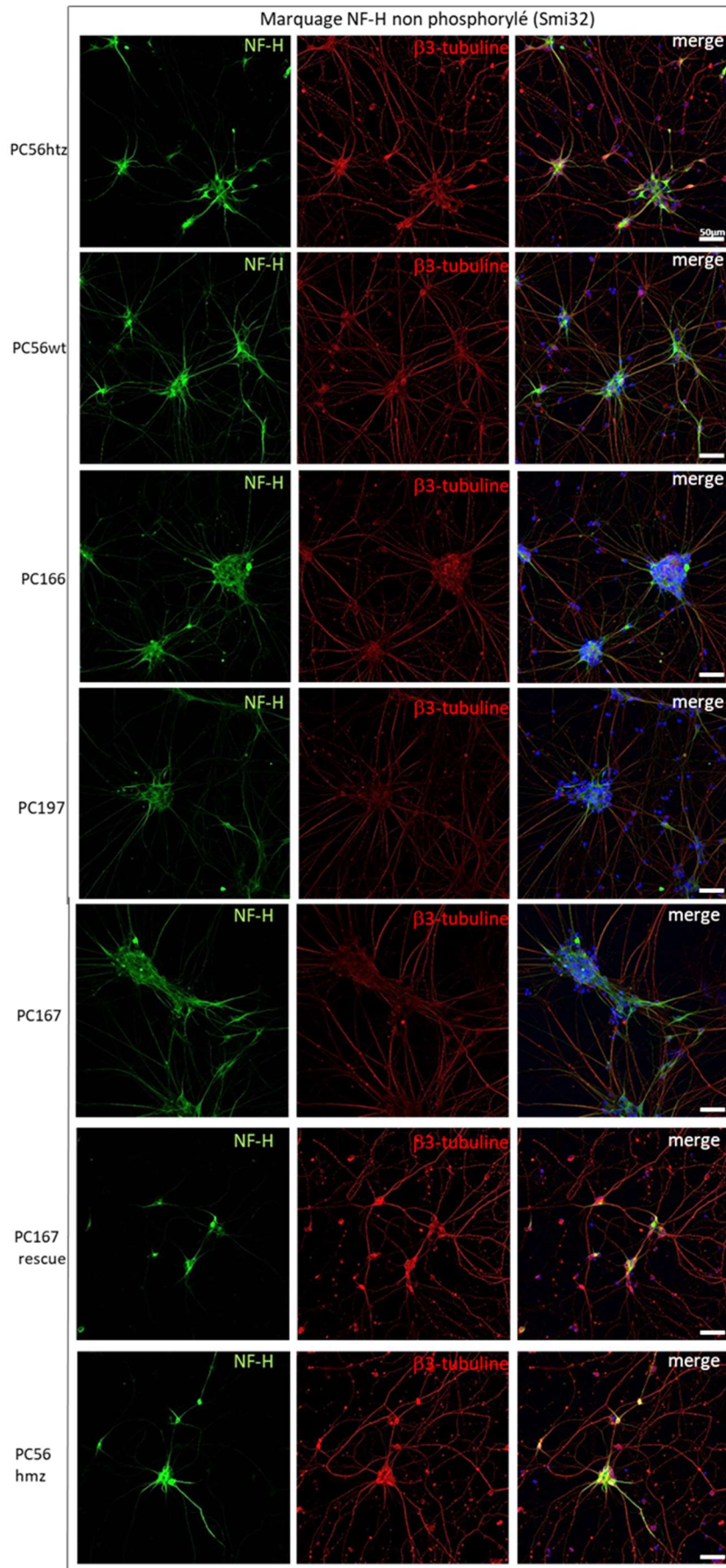


Figure 38: Analyse par microscopie confocale des immunomarquages des NF-H(Smi32) non phosphorylés de la différenciation n°1.

Marquages effectués J24 de différenciation. Grossissement x20. Barre d'échelle : 50µm

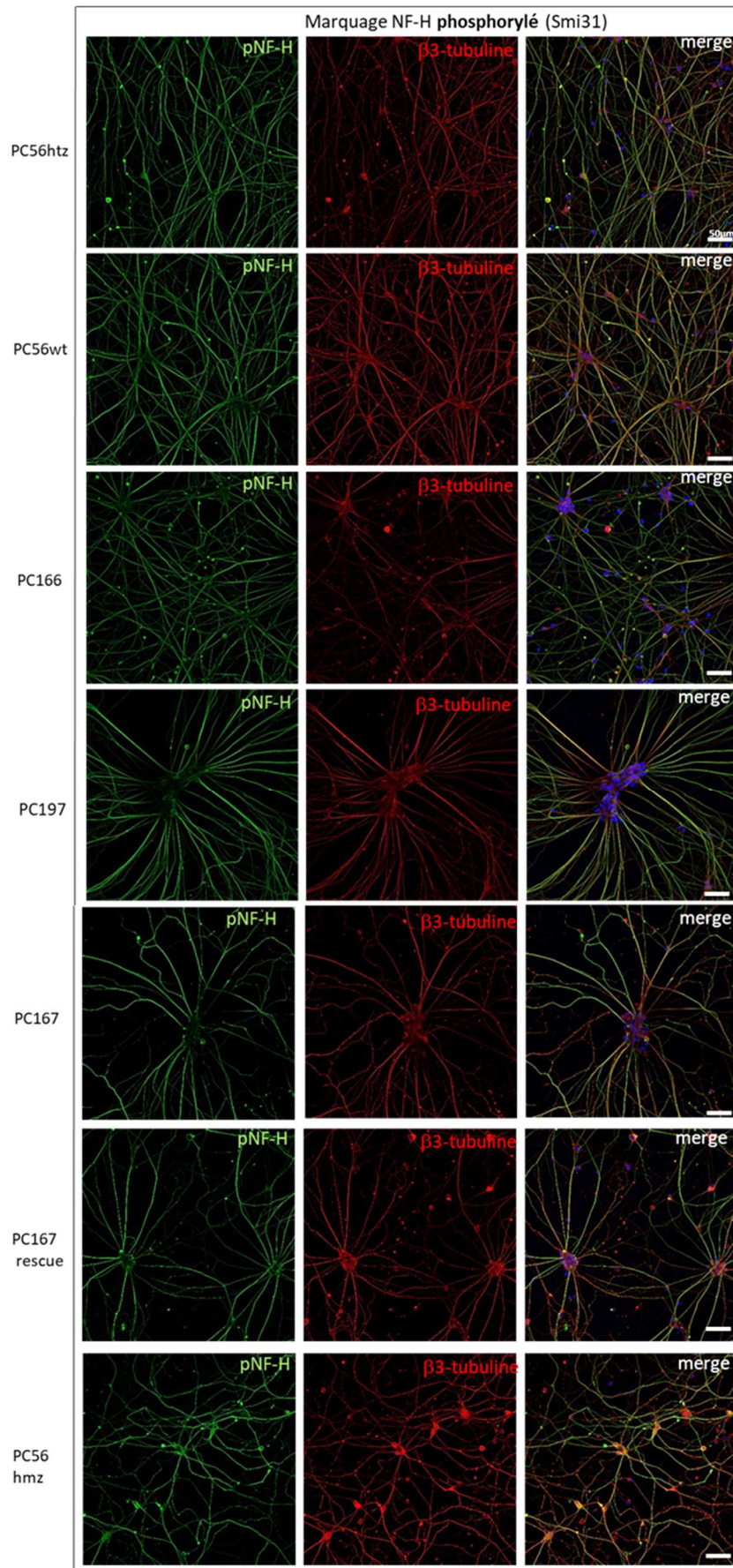


Figure 39: Analyse par microscopie confocal des immunomarquages des NF-H phosphorylés (Smi31) de la différenciation n°1. Marquages effectués à J24 de différenciation. Grossissement x20. Barre d'échelle : 50µm

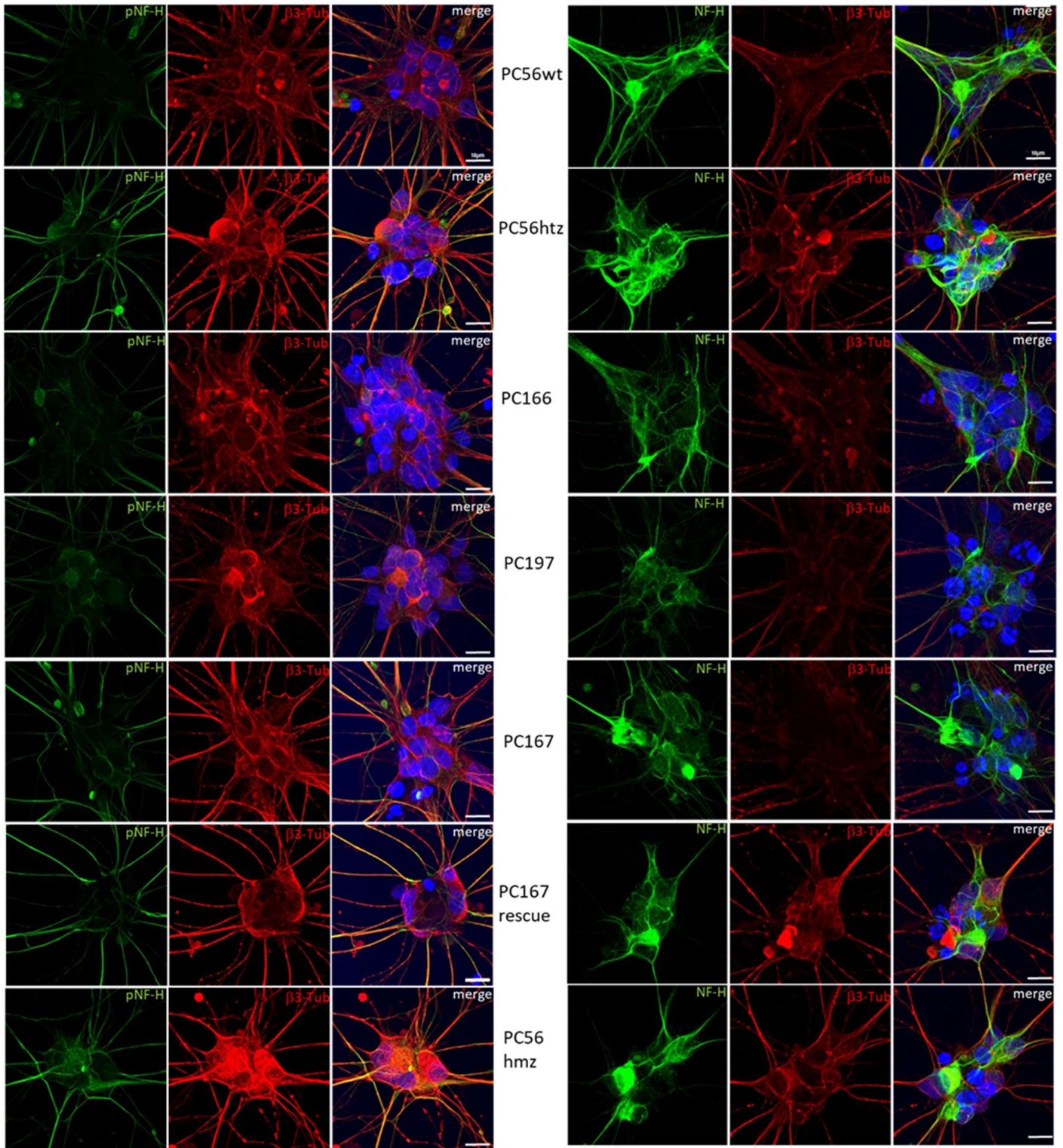


Figure 40: Analyse par microscopie confocale des immunomarquages de la différenciation n°1 NF-H non phosphorylée ou phosphorylée (en vert), β 3tubuline (en rouge) et Dapi (en bleu). Lignées : 2 contrôles (PC197 et PC56wt), 2 lignées patients hétérozygotes (PC167 et PC166), une lignée crisper hétérozygote, une lignée crisper homozygote (PC56hmz) et une lignée crisper « rescue » (PC167 rescue). Marquages effectués J24 de différenciation. Grossissement x63 zoom2. Barre d'échelle : 10 μ m

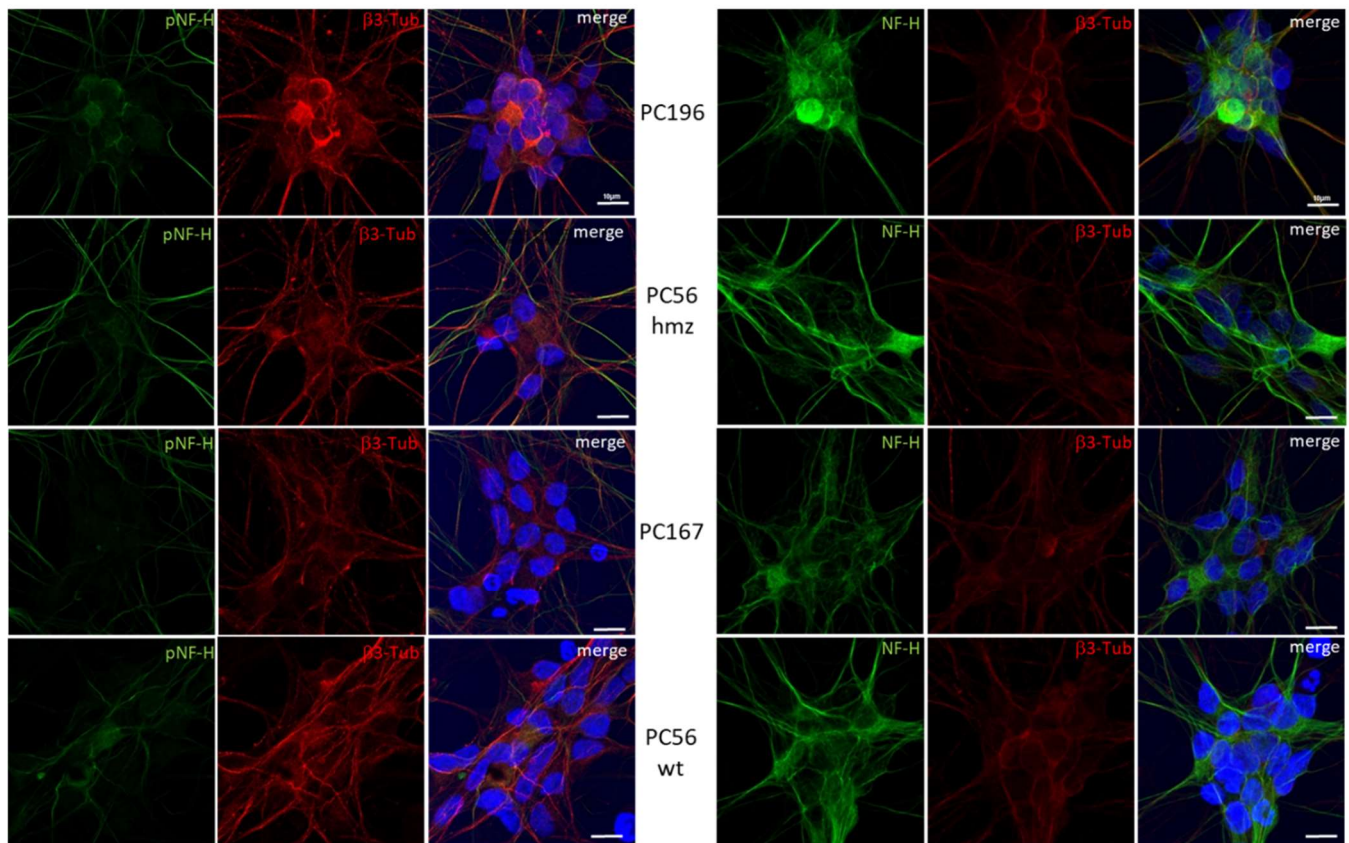


Figure 41: Analyse par microscopie confocal des immunomarquages de la différenciation n°2. NF-H non phosphorylés ou phosphorylés (en vert), β 3tubuline (en rouge) et Dapi (en bleu). Lignées : 2 contrôles (PC196 et PC56wt), 1 lignée patient hétérozygotes (PC167), 1 lignée crisper homozygote (PC56hmz). Marquages effectués J24 de différenciation. Grossissement x63 zoom 2. Barre d'échelle : 10 μ m

2. Analyse des variants par Western Blot

Afin de déterminer si les mutations dans le gène NF-H affectent les niveaux de la protéine, nous avons réalisé des extraits protéiques à partir des cultures de motoneurones à différents temps de différenciations. Des Western Blot (WB) ont ensuite été réalisés et analysés. Dans un premier temps, les anticorps CAE1 et CAE2 ont été testés pour détecter la forme mutée de la protéine dans les extraits. Dans un second temps, la quantification de la protéine NF-H dans les 6 lignées sur 7 (en raison de l'échec de différenciation de la lignée PC167) a été réalisée.

a) Test des anticorps CAE1 et CAE2

Les anticorps CAE1 et CAE2 ont été testés sur les extraits de protéines issus de motoneurones. Les extraits protéiques de la lignée PC196, PC166 et PC56Hmz ont été réalisés au jour 24 et 32 de différenciation. Afin de déterminer si les sérums CAE1 et CAE2 reconnaissaient bien la forme mutée de NF-H, des cellules HEK293T ont été transfectées avec soit un plasmide eGFP-NF-H wt soit eGFP-NF-H muté. Après électrophorèse des extraits cellulaires sur gel de polyacrylamide et transfert sur

membranes de nitrocellulose, des marquages des protéines NF-H non phosphorylées (Anticorps smi32), NF-M et les 2 anticorps CAE1 et CAE2 ont été effectués. Les images des membranes après révélation au Chemidoc sont présentées dans la figure 42.

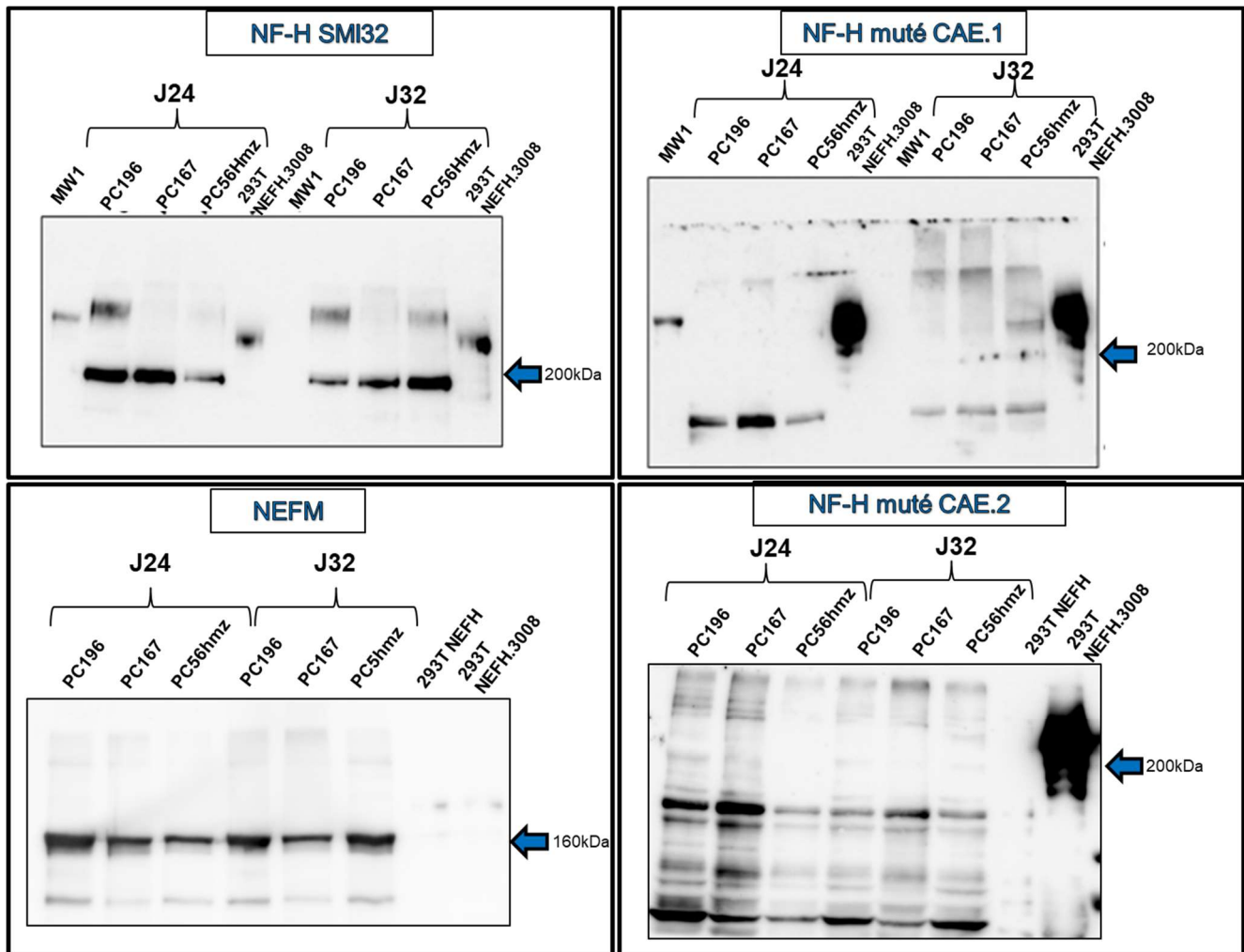


Figure 42: Analyse par Western Blot des extraits protéiques de motoneurons après 24 jours (J24) ou 32 jours (J32) de différenciation *in vitro*.

MW1 : marqueur de poids moléculaire. Lignée *iPS* PC196, PC167, PC56hmz. Contrôle positif par transfection de HEK293T par un plasmide codant pour la forme mutée c.3008_3009del (p.Lys1003Argfs*59) du gène NF-H fusionné à la GFP. Protéines révélées par l'anticorps smi32 (NF-H), NF-M (NF-M) NF-H CAE.1 (NF-H muté), et NF-H CAE.2 (NF-H muté).

Les deux sérums CAE reconnaissent de nombreuses bandes à différents poids moléculaires pour les lignées de motoneurons aux deux temps de différenciations. Dans les deux extraits protéiques issus des surexpressions, les sérums CAE1 et CAE2 semblent néanmoins ne reconnaître que la forme mutée (absence de bande dans la colonne 293T NEFH à 200kDa). Le contrôle NF-H smi32 permet de prouver que les lignées de motoneurons expriment bien la protéine NF-H et devraient être reconnues par les CAE si celle-ci est mutée. Pour les deux Ac CAE, surtout CAE1, une bande est visible pour la lignée PC56Hmz à 32 jours de différenciation mais pas visible dans

les autres extraits. Cette bande se situe approximativement au même poids moléculaire que dans la lignée 293 eGFP-NF-H muté.

En conclusion, les anticorps CAE1 et CAE2, tous deux spécifiques de NF-H mutée, reconnaissent la protéine surexprimée mais ne permettent pas de mettre en évidence une accumulation de protéine mutée dans nos extraits de motoneurones hétérozygotes à ce stade. De façon intéressante, un faible signal est détecté à la taille attendue dans les extraits pc56 homozygotes à J32. Malheureusement, un temps de différenciation de 32 jours n'est pas compatible avec le criblage de chimiothèque mais la présence de ce signal permet de valider la construction CRISPR/Cas9 de cette lignée et ouvre des perspectives d'étude à plus long terme.

b) Protéine NF-H

N'ayant pas de résultats probants avec les sérums CAE1 et CAE2 en Western Blot, nous avons cherché à quantifier la quantité de protéines NF-H dans des extraits protéiques de motoneurones à 24 jours de différenciation. Les extraits protéiques sont issus de la différenciation n°1 et n°2. A partir d'une boîte de pétri 100mm, la quantité de protéines par boîte a été calculée avec un dosage Bradford. Les résultats sont présentés dans le tableau 6.

Tableau 6: Quantités de protéines obtenues par lignée avec un dosage Bradford

| Dosages des protéines pour les différenciations n°1 et 2 par méthode Bradford | | | | | | | | |
|---|---------------------|--------------|---------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | différenciation n°2 | | différenciation n°1 | | | | | |
| | PC56 hmz | PC196 Wt | PC197 wt | PC166 htz | PC167 rescue | PC56 htz | PC56 hmz | PC56 wt |
| dosage 595 | 0,409 | 0,395 | 0,477 | 0,457 | 0,36 | 0,366 | 0,356 | 0,5 |
| Concentration (µg/µl) | 1,81 | 1,72 | 3,05 | 2,98 | 1,20 | 1,27 | 1,04 | 3,22 |
| volume solution protéique (µl) | 125 | 125 | 125 | 125 | 100 | 125 | 100 | 100 |
| quantité totale de protéine (µg) | 226,4 | 214,4 | 381,7 | 371,9 | 120,3 | 159,1 | 103,8 | 321,8 |

Les Western Blot ont été réalisés en déposant 20µg de protéines par lignée. Les extraits des deux différenciations (Diff1 et Diff2) ont été déposés sur le même gel et analysés séparément. Les anticorps contre la protéine NF-H non phosphorylée et phosphorylée ont été utilisés pour quantifier les niveaux de protéine présents dans chaque lignée (fig 43A). Les quantifications ont été réalisées avec le logiciel BIORAD et ont été normalisées par rapport à la quantification de la coloration de la membrane au TCE (Trichloroethanol) (fig 43B). Elles sont représentées dans les graphiques de la figure 43.

Les résultats de la différenciation n°1 sont montrés dans la figure 43. La figure43A montre les images acquises au Chemidoc de la révélation du marquage NF-H et NF-H phosphorylé (les deux protéines ont une poids moléculaire d'environ 200KDa. La figure 43B correspond à l'image de la coloration au TCE. Les quantifications (figure 43C) montrent une augmentation de pNF-H et de NF-H dans les 2 lignées hétérozygotes, représentées en orange dans la figure 43C, et la lignée homozygotes (représentée en rouge) par rapport aux 3 lignées contrôle (PC197, PC56wt et

PC167rescue représentées en bleu). La quantité totale de NF-H (phosphorylé et non phosphorylé) estimée par rapport à la coloration au TCE est représentée dans le graphique.

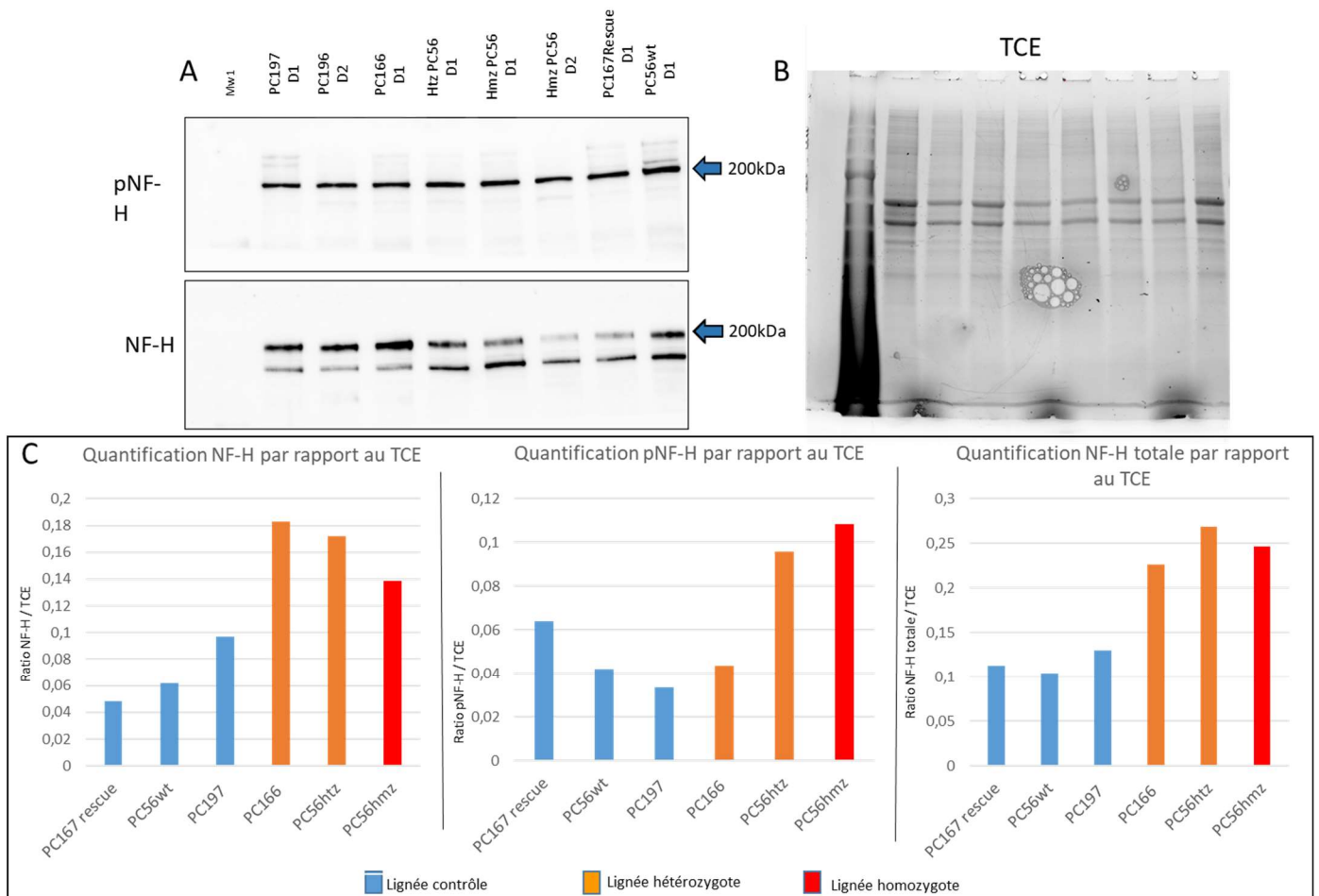


Figure 43: Analyse par Western Blot des extraits protéiques de MNs au 24 jours (J24) et quantifications protéiques de NF-H. A) Protéines révélées par l'anticorps SMI32 (NF-H), SMI31 (pNF-H) des lignées issues de la différenciation n°1 (noté M1) et n°2 (noté M2). MW1 : marqueur de poids moléculaire. B) Protéines totales du gel d'électrophorèse contenant du Trichloroethanol (TCE) révélées au Chemidoc. C) Graphiques montrant les rapports de la quantité de NF-H ou pNF-H ou NF-H totale (somme de NF-H et pNF-H) sur protéines totales révélées au TCE. Quantification faites avec le logiciel Biorad.

La quantification de l' α -Tubuline par rapport au TCE montre également une tendance à l'augmentation dans les lignées hétérozygotes et homozygotes par rapport aux lignées contrôles (fig 44). Ce résultat préliminaire doit encore être vérifié en effectuant de nouveau la différenciation. Si cela est avéré, ce résultat permettrait de regarder ce phénotype lors des tests de molécules repositionnables. Cela ouvre également des pistes à explorer concernant la stabilisation des microtubules (responsable du transport axonal). Il sera intéressant d'analyser si le transport est modifié par la mutation comme montré dans d'autres CMT⁵².

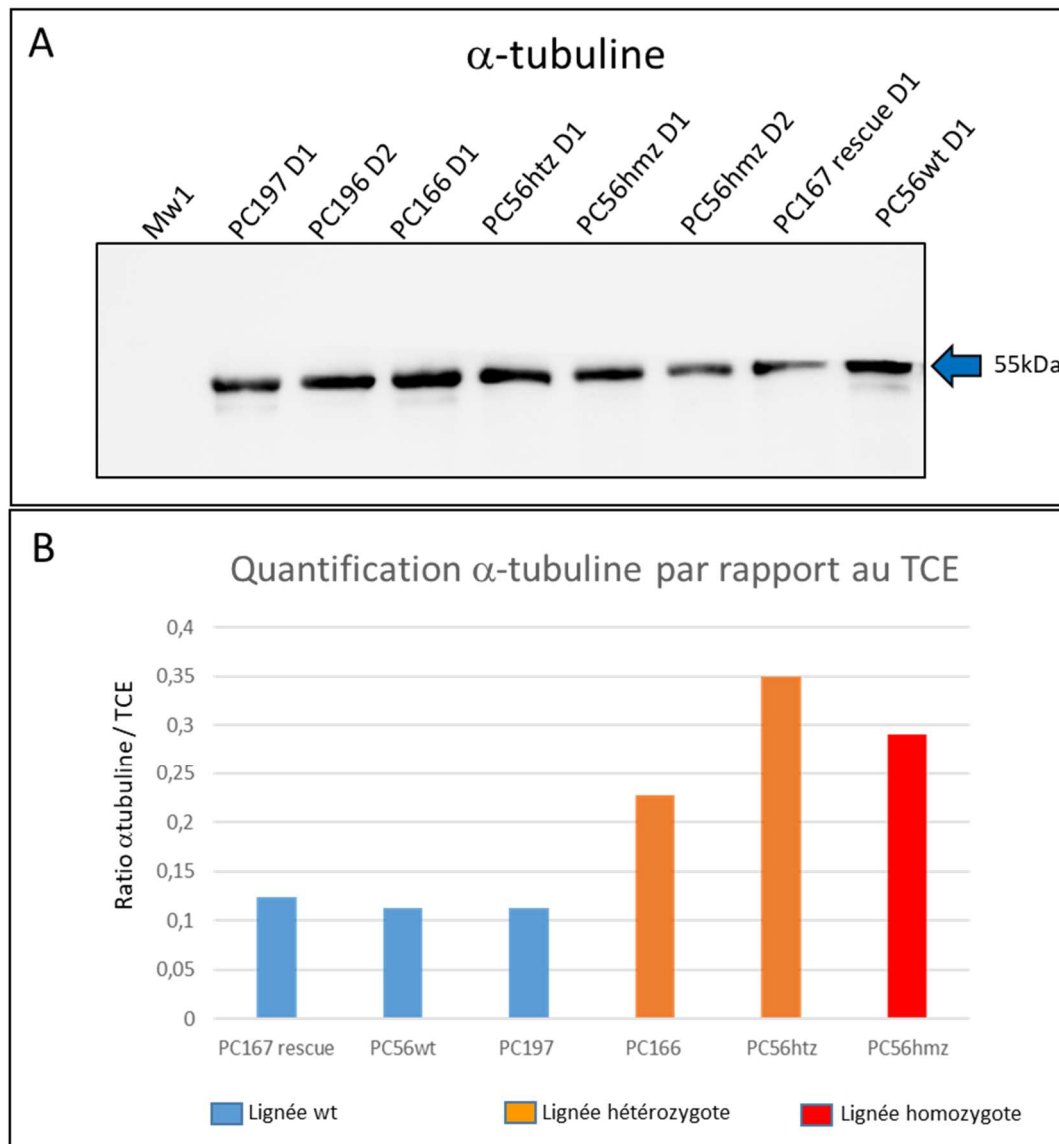


Figure 44: Analyse par Western Blot des extraits protéiques de MNs et quantification protéique de α -tubuline.

A) Protéines révélées par l'anticorps anti α -tubuline des lignées issues de la différenciation n°1 (noté M1) et n°2 (noté M2). MW1 : marqueur de poids moléculaire. B) Protéines totales du gel d'électrophorèse contenant du TCE révélés au Chemidoc. C) Graphique montrant le rapport de la quantité d' α -tubuline sur protéines totales révélées au TCE. Quantification faite avec le logiciel Biorad.

La quantification de la seconde différenciation (2 lignées) a donné des résultats différents de la première (fig 43et 44 vs fig 45). En effet, la quantification de NF-H et pNF-H ainsi que la quantité totale de NF-H sont diminuées dans la lignée homozygote par rapport au contrôle. La quantité d' α -Tubuline n'est pas augmentée dans la lignée homozygote par rapport à la lignée contrôle (fig 45).

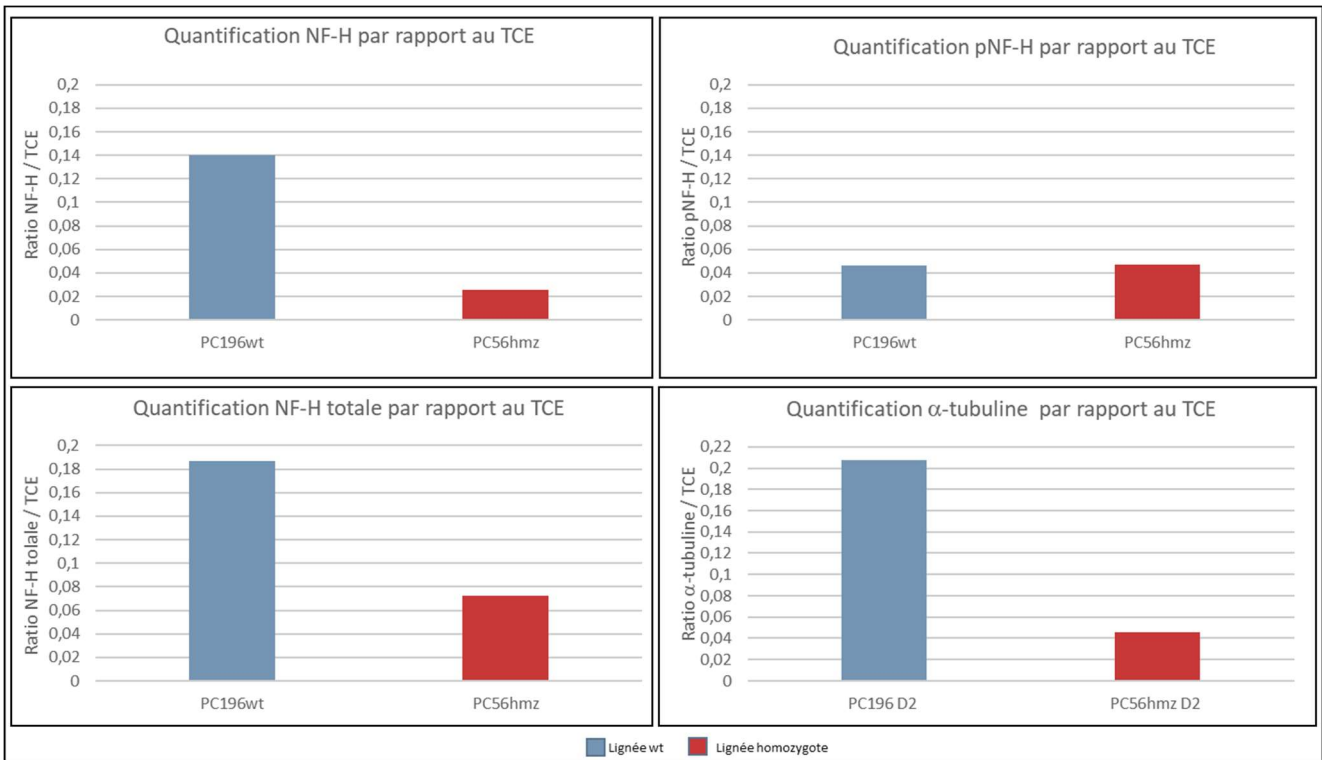


Figure 45: Graphiques de quantifications de NF-H non phosphorylé, NF-H phosphorylé, NF-H totale et α -tubuline par rapport au TCE pour la différenciation n°2.

Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer de plusieurs façons et soulignent l'importance de comparer entre elles les différenciations menées en parallèle. Une première cause pourrait être une différence de maturation des motoneurones entre ces deux différenciations qui ont utilisé des lots de réactifs différents. Les immunofluorescences sur les motoneurones n'ont pas mis en évidence de différence visuellement. Lors de la prochaine différenciation, une quantification du signal de NF-H entre les lignées devra être effectuée pour voir s'il y a une différence de croissance ou de développement axonal. Une seconde explication pourrait résulter du protocole d'extraction et des lavages réalisés avant l'extraction protéique. Dans ce sens, nous avons fait évoluer notre protocole pour éviter l'étape de lavage et de centrifugation des cellules pour une extraction totale dans un volume réduit à même la boîte de culture, cela sera utilisé lors de la prochaine différenciation.

3. Analyse des variants par Transcriptomique

a) Extraction ARN

Les analyses des marquages en immunofluorescence et les analyses protéiques n'ont pas permis pour le moment de mettre en évidence de voie permettant de déterminer un phénotype précis lié à la mutation. Afin de visualiser de manière globale des modifications transcriptionnelles, nous avons décidé de réaliser le séquençage des ARN produits dans les différentes lignées pour visualiser si la mutation engendre des modifications de la transcription de certains gènes.

Pour cela, les cellules ont été cultivées en boîtes de 60mm de diamètre. Chaque lignée a été cultivée en triplicatas et récupérée après 24 jours de différenciation (J24) puis

congelée à -80°C jusqu'à l'extraction des ARN. Après décongélation, les ARN ont été extraits avec le kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) puis les ARN dosés au Nanodrop et contrôlés sur gel d'agarose. Les résultats des dosages sont présentés dans le tableau 7. Le gel d'agarose permet de visualiser la qualité de l'ARN et les résultats de quelques contrôles qualité au Bioanalyseur sont présentés dans la figure 46. Les contrôles sur gel des ARN permettent de visualiser les bandes d'ARN ribosomique 28S et 18S. La bande de l'ARN 5S n'est pas visible sur la figure 46A. Le Bioanalyseur permet de montrer également une bonne qualité des ARN avec des pics présents au 28S, 18S et 5S. Le numéro d'intégrité de l'ARN (RIN pour *RNA integrity number*) est calculé par le Bioanalyseur et permet, grâce à un algorithme, de calculer l'intégrité de l'ARN en comparant la fraction 28S et la fraction 18S de l'ARN à partir des mesures d'ARN obtenues à l'aide de l'électrophorèse sur gel capillaire. Les valeurs se situent entre 1 (ARN de mauvaise qualité) et 10 (ARN de très bonne qualité). La limite admise par I-STEM pour lancer le séquençage est de 7 et tous nos ARN sont supérieurs (tableau 7 et fig 46B). Les contrôles qualité ont donc permis de montrer la bonne qualité des échantillons qui vont pouvoir être utilisés pour l'analyse de transcriptomique.

Tableau 7: Dosage des ARN extraits des motoneurones après 24 jours de différenciation sur 9 lignées et 2 différenciations différentes (D1 et D2) sur nano drop et par Bioanalyser.

| Extraction ARN | | | | | |
|----------------|------------|-----------------------------|-------------|--------------------------------|-----|
| Lignée | n° Extrait | [] ng/ μ l Nanodrop | quantité ng | [] ng/ μ l Bioanalyser | Rin |
| PC167 | 1 | 34 | 1360 | 34 | 8 |
| | 2 | 30 | 1200 | 27 | 8,6 |
| | 3 | 24 | 960 | 23 | 8,7 |
| pc56wt | 1 | 70 | 2800 | 79 | 8,3 |
| | 2 | 65 | 2600 | 51 | 8,7 |
| | 3 | 65 | 2600 | 70 | 7,5 |
| PC197 | 1 | 93 | 3720 | 126 | 8,6 |
| | 2 | 93 | 3720 | 76 | 8,4 |
| | 3 | 92 | 3680 | 85 | 8,5 |
| PC196 | 1 | 82 | 3280 | 88 | 9,2 |
| | 2 | 80 | 3200 | 77 | 9,3 |
| | 3 | 85 | 3400 | 74 | 9 |
| PC56 Hmz D2 | 1 | 75 | 3000 | 67 | 9,3 |
| | 2 | 67 | 2680 | 51 | 9,5 |
| | 3 | 68 | 2720 | 58 | 9,3 |
| PC56wt D2 | 1 | 95 | 3800 | 71 | 9,5 |
| | 2 | 70 | 2800 | 61 | 9,5 |
| | 3 | 105 | 4200 | 95 | 9,3 |
| PC56 hmz D1 | 1 | 35 | 1400 | 34 | 9,6 |
| | 2 | 32 | 1280 | 33 | 8,5 |
| | 3 | 40 | 1600 | 27 | 9,2 |
| PC56 htz | 1 | 26 | 1040 | 16 | 8,9 |
| | 2 | 30 | 1200 | 32 | 9,1 |
| | 3 | 40 | 1600 | 43 | 8,9 |
| PC166 | 1 | 56 | 2240 | 59 | 8,7 |
| | 2 | 85 | 3400 | 78 | 9 |
| | 3 | 80 | 3200 | 79 | 8,9 |

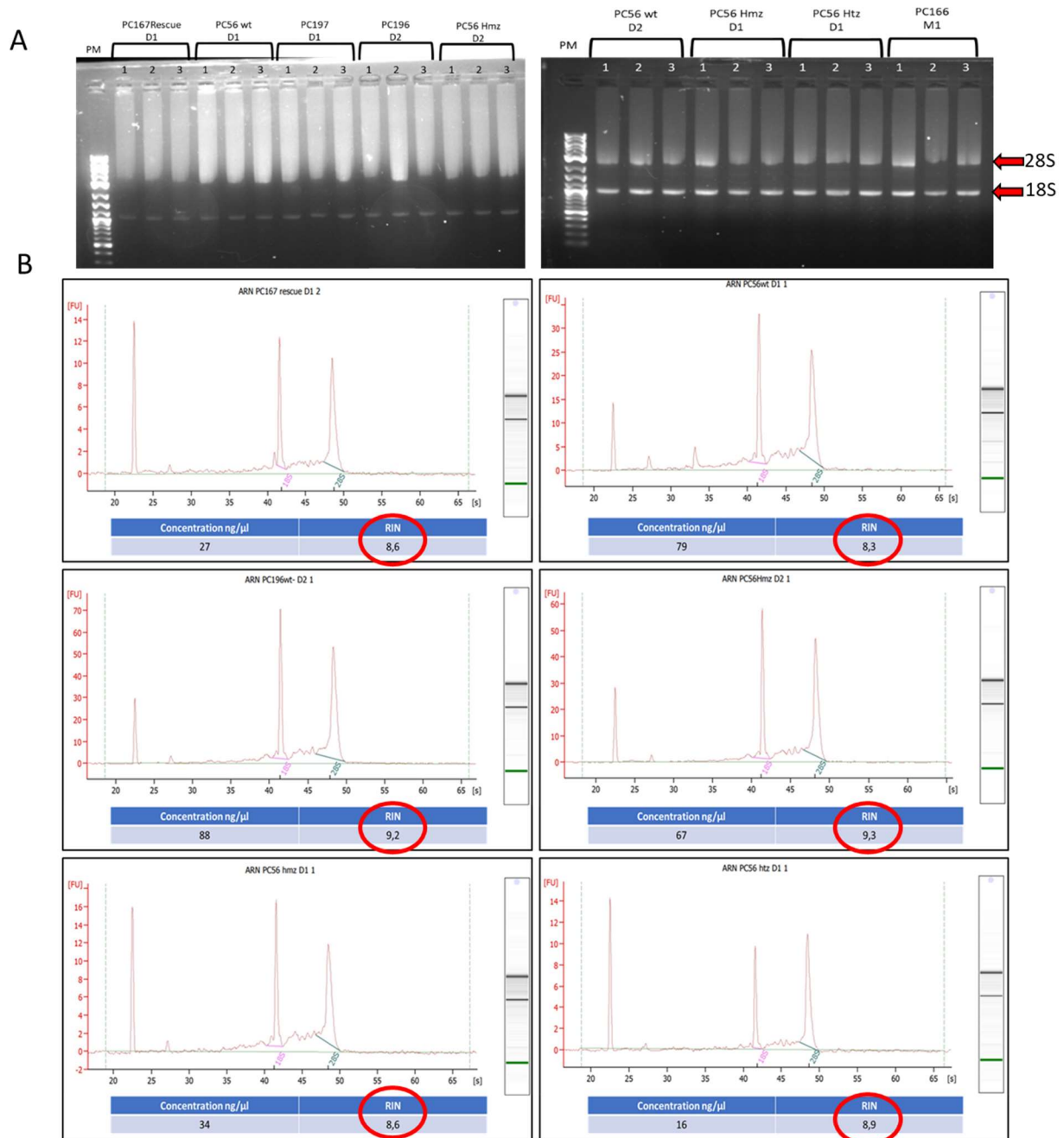


Figure 46: Contrôle des ARN sur gel agarose et par Bioanalyser.

A) Images des 27 ARN extraits après migration sur gel agarose avec visualisation de la bande 28S et 18S. B) Résultats du contrôle des ARN par Bioanalyser (seulement 1 échantillon par lignée est représenté) (fait par société I-STEM). Visualisation des pics correspondant à l'ARN 28S et 18S permettant au Bioanalyser de calculer le RIN (cercle rouge)

b) Transcriptomique

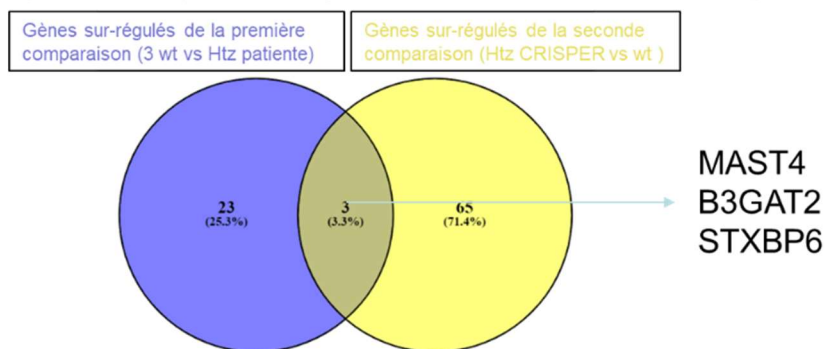
Le séquençage et l'analyse bio-informatique ont été réalisés par la plateforme NGS de l'institut I-STEM. Après séquençage des différentes conditions et réalisation de l'analyse, deux types de comparaisons ont été effectués. La première comparaison a été faite entre la lignée de patient PC166 et les 3 lignées « contrôles » PC56wt, PC196 et PC197. L'analyse bio-informatique a permis d'identifier 153 gènes dont

l'expression est dérégulée dans la lignée PC166 (26 gènes sur-exprimés et 127 sous-exprimés (correspondant au cercle violet de la figure 47A et B)).

La seconde comparaison a été effectuée entre les lignées isogéniques PC56wt, PC56 htz CRISPR et PC56 hmz CRISPR. Les lignées CRISPR ont été générées à partir de la lignée PC56wt, ce qui permet de comparer des lignées ayant le même fond génétique. Les gènes dérégulés entre la lignée PC56wt et PC56 Htz ont donc été comparés. L'analyse bio-informatique a identifié 68 gènes dont l'expression est augmentée et 31 dont l'expression est diminuée (correspondant au cercle jaune de la figure 47B). La comparaison de PC56wt et PC56Hmz a mis en évidence 183 gènes dérégulés correspondant au cercle vert de la figure 48 (99 surexprimés et 83 sous exprimés).

Afin de déterminer si des gènes dérégulés sont identiques dans les deux analyses décrites précédemment, nous les avons comparés entre eux (fig 47). Pour les gènes surexprimés, la combinaison des deux analyses a mis en évidence 3 gènes d'intérêt qui sont MAST4, B3GAT2 et TSXBP6 (fig 47A). Pour les gènes sous-exprimés, 5 gènes entre les deux comparaisons sont présents: GDNF, TBX2, MGAT4C, FGF10, NKX6-1 (fig 47 B).

A Comparaison des gènes sur-régulés WT vs muté PC56htz et PC166 (patiente)



B Comparaison des gènes sous-régulés WT vs PC56htz et PC166 (patiente)

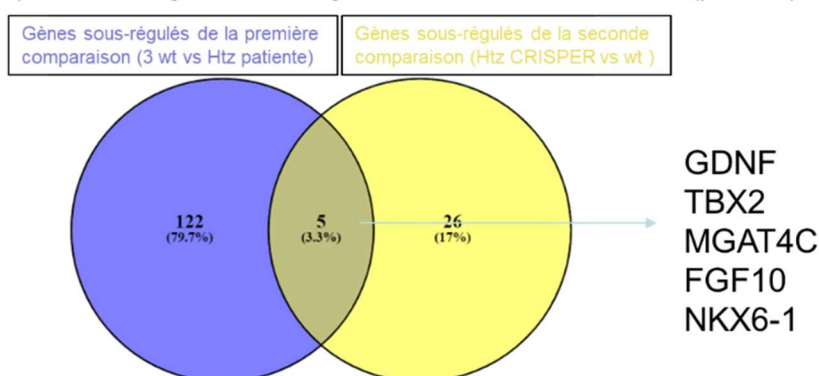


Figure 47 : Comparaison des gènes dérégulés de deux analyses de transcriptomique

A) Comparaison des gènes surexprimés de la comparaison entre les lignées contrôle (PC56wt, PC197, PC196) et la lignée du patient (PC166) représenté par le cercle violet et les gènes surexprimés de la comparaison entre la lignée contrôle PC56wt et la lignée PC56htz représenté par le cercle jaune. B) Comparaison des gènes sous-exprimés de la comparaison entre les lignées contrôle (PC56wt, PC197, PC196) et la lignée du patient (PC166) représenté par le cercle violet et les gènes sous-exprimés de la comparaison entre la lignée contrôle PC56wt et la lignée PC56htz représenté par le cercle jaune

Enfin, un diagramme de Venn a été réalisé en intégrant la lignée homozygote et les résultats sont représentés en figure 48. La comparaison des gènes dérégulés entre les lignées Wt, les lignées Htz et Hmz montre une modification significative de l'expression de 6 gènes. Les gènes DRGX, PHOX2A, TBX3, B3GAT2, STXBP6 sont sur-exprimés et FGF10 est sous-exprimé par rapport aux lignées contrôle. Parmi ces 6 gènes, 5 gènes semblent impliqués dans le développement neuronal et potentiellement dans la détermination de sous-types de neurones ou motoneurones (tableau 8). Il se pourrait donc que la mutation affecte préférentiellement la survie de certains sous-types de motoneurones *in vitro*, comme cela est observé chez les patients qui présentent une atteinte primaire de la colonne latérale des motoneurones lombaires, ayant de fait les croissances axonales les plus longues.

Afin de comprendre si des voies de signalisations particulières sont affectées entre les motoneurones de patient mutés et les contrôles (153 gènes dérégulés) ou les motoneurones isogéniques hétérozygotes pour NF-H et contrôles (99 gènes dérégulés), une analyse d'enrichissement a été effectuée *via* l'outil d'analyse Enrichr. Ainsi, l'analyse basée sur les Processus biologiques 2021 de « Gene Ontology » montre un enrichissement de gènes impliqués dans le développement du système nerveux pour les cellules de patients et dans le développement embryonnaire d'organes pour les motoneurones isogéniques (fig 49A). De plus, l'analyse basée sur les données du KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) montre un enrichissement dans l'interaction ligands neuroactifs avec son récepteur pour les motoneurones de patient et de la voie de signalisation du calcium ainsi que du guidage axonal pour les motoneurones isogéniques (fig 49B).

Ces analyses semblent donc incriminer un problème neurodéveloppemental survenant de manière précoce dans la culture *in vitro* et reflétant probablement une susceptibilité différentielle des sous types de neurone *in vitro*.

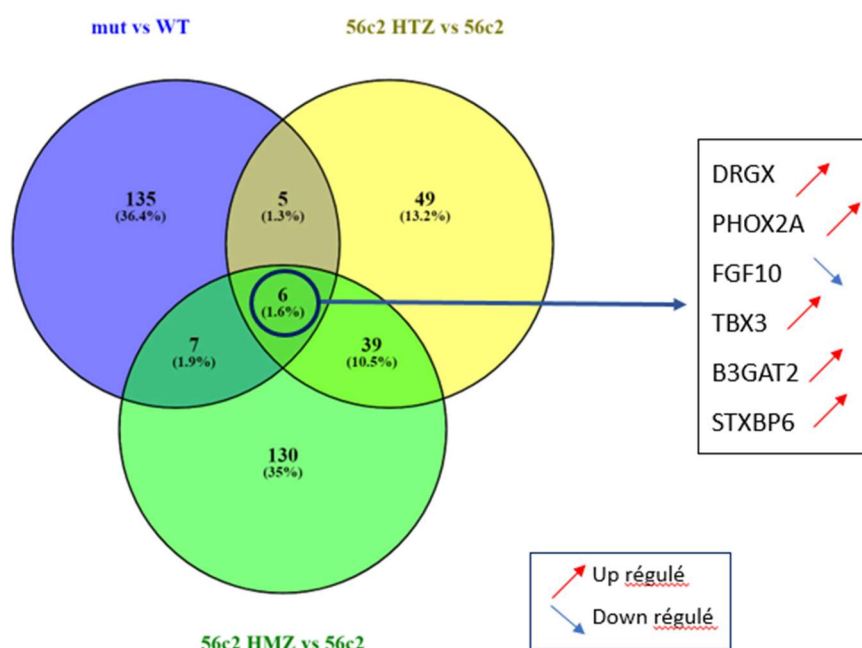


Figure 48: Diagramme de Venn montrant les résultats des analyses de transcriptomique des différentes comparaisons.

Cercle violet représente les gènes dérégulés dans la comparaison entre les lignées contrôles et la lignée du patient (PC166). Le cercle jaune représente les gènes dérégulés de la comparaison entre la lignée contrôle PC56wt et la lignée PC56htz. Le cercle vert représente les gènes dérégulés de la comparaison entre la lignée contrôle PC56wt et la lignée PC56hmz. L'intersection des 3 comparaisons permet d'obtenir 6 gènes communs qui sont dérégulés (soit surexprimé soit sous exprimés).

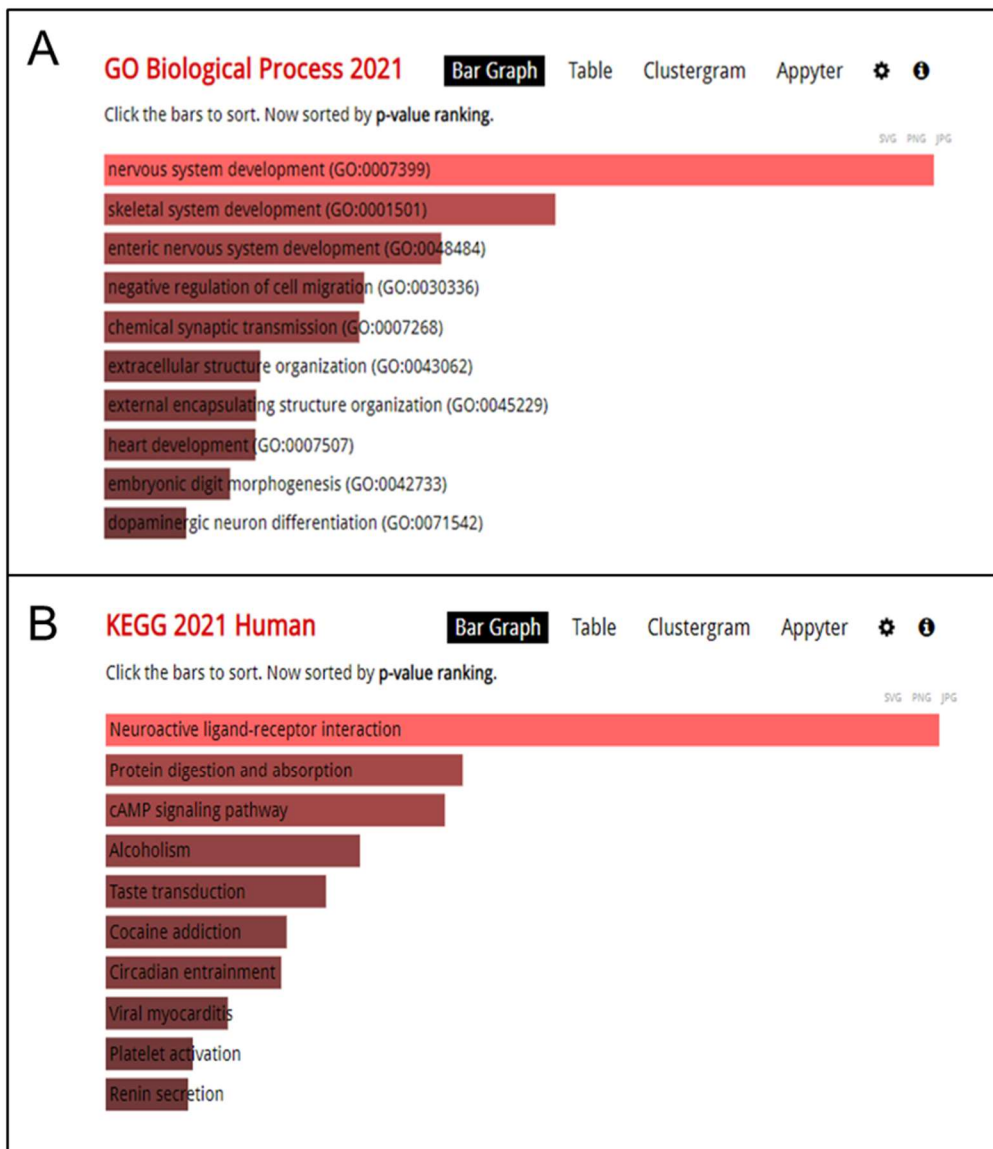


Figure 49: Analyse d'enrichissement par Enrichr des 153 gènes dérégulés entre la lignée patient mutée et les lignées contrôle.

A) Analyse basée sur les Processus biologiques 2021 de « Gene Ontology ». B) Analyse basée sur les données du KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

Tableau 8: Gènes d'intérêts et leurs fonctions.

| Nom du gène | Abréviation | Fonctions |
|--|-------------|--|
| <i>Dorsal Root Ganglia Homeobox</i> | DRGX | DRG11 est exprimé dans la plupart des neurones sensoriels mais pas dans les neurones sympathiques ou les cellules gliales. Il intervient dans l'établissement ou le maintien de la connectivité entre les neurones sensoriels et leurs cibles du système nerveux central ⁵³ . |
| <i>Paired Like Homeobox 2A</i> | PHOX2A | Les gènes Phox2A est exprimé spécifiquement dans les types de cellules noradrénergiques ⁵⁴ et joue un rôle dans à la différenciation et le maintien du neurone noradrénergique ⁵⁵ . |
| <i>Fibroblast growth factor 10</i> | FGF10 | FGF10 est impliqué dans différents processus biologiques tels que le développement embryonnaire, la croissance cellulaire, la morphogenèse et la différenciation pré-synaptique ⁵⁶ . |
| <i>Beta-1,3-Glucuronyltransferase 2</i> | B3GAT2 | B3GAT2 participe à la biosynthèse de l'épitope glucidique HNK-1. HNK-1 joue un rôle dans la migration cellulaire et l'adhésion exclusivement dans le système nerveux ⁵⁷ . |
| <i>Syntaxin Binding Protein 6</i> | STXBP6 | STXBP6 permet l'assemblage des complexes SNARE ce qui implique la protéine dans le transport des vésicules de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique et donc un rôle dans l'exocytose ⁵⁸ . |
| <i>T-Box Transcription Factor 3</i> | TBX3 | TBX3 est un répresseur transcriptionnel ou activateur transcriptionnel. Il intervient donc dans la différenciation cellulaire dans de nombreux tissus ⁵⁹ . |

VI. Discussions et perspectives

A. Protocole de base

Durant ces 3 années de préparation de mon diplôme d'EPHE, j'ai pu mettre au point et optimiser un modèle de culture de MNs humains basé sur la différenciation de cellules iPS humaines au sein du laboratoire PGNM. L'obtention de MN en culture 2D reste à l'heure actuelle le modèle le plus abouti et convient à l'étude de nouveaux variants de signification inconnue (*VUS*) dans un contexte de cellules humaines. Ce modèle est utilisé dans d'autres projets de recherche qui sont en cours au laboratoire aussi bien pour des pathologies héréditaires d'origine génétique avec la poursuite d'étude de l'article Jacquier *et al*, 2022⁶⁰ sur des motoneurones (annexe 4) que pour des pathologies acquises, telles que l'intoxication au protoxyde d'azote consécutive à une utilisation récréative chronique. Des tests de toxicité effectués sur les motoneurones humains dérivés d'iPS nous ont permis de caractériser les mécanismes physiopathologiques associés à l'abus de protoxyde d'azote (article soumis).

B. Co cultures

Le développement des modèles de co cultures associé à la culture 3D a montré des résultats encourageants. La caractérisation poussée des cellules doit encore être menée et de nombreux ajustements restent à faire notamment sur la durée de co culture, le nombre de cellules initial, la matrice et les supports de culture utilisés. Les modèles de puces microfluidiques peuvent aussi améliorer la caractérisation des pathologies génétiques grâce à l'étude des contributions des types cellulaires environnants.

a. MN et cellules de Schwann

Un exemple d'interaction cellulaire classique réside dans l'induction de la myélinisation des axones par les cellules de Schwann initiée par l'interaction physique entre cellules de Schwann et motoneurone. Malheureusement, le modèle de co culture 2D de cellules de Schwann (lignée S16 de rat) et de motoneurones humains n'a pas permis d'obtenir une myélinisation des axones. Il est à noter que de nombreux laboratoires dans le monde essaient de produire des cultures de cellules de Schwann myélinisantes mais aucun protocole n'est disponible à ce jour. Nos co cultures ont néanmoins montré que les deux types cellulaires interagissaient, la présence des MNs induisant une modification de la forme des cellules de Schwann. Le modèle 2D n'est peut-être pas adapté pour cette coculture et il serait nécessaire de développer un modèle 3D. En effet la myélinisation des axones est peut-être bloquée dans la culture 2D où les cellules de Schwann ne sont pas contraintes et où les facteurs diffusibles se diluent. Afin de tester cette hypothèse, nous avons développé des sphéroïdes mixtes à partir de MNs et de cellules de Schwann mis en culture en goutte de Matrigel. Nous n'avons pas encore observé de myélinisation et nous continuons à adapter le protocole. Une autre possibilité serait d'utiliser une des deux lignées humaines de cellules de Schwann dont nous disposons au laboratoire. Ces cellules sont plus

déliçates à cultiver que les S16 de rat mais elles pourraient constituer une alternative intéressante n'utilisant que des cellules humaines.

Enfin, il a été montré que les cellules de Schwann modifient la phosphorylation de NF-H dans les motoneurones, ce qui favorise la croissance radiale des axones¹⁸. Ainsi, il serait intéressant dans l'étude des variants de NF-H de réaliser des co-cultures entre des cellules de Schwann et des MNs, ce qui permettrait peut-être de faire émerger un phénotype cellulaire pathologique.

b. MN et myotubes

Un autre exemple d'interaction cellulaire notable est celui du motoneurone avec sa cible musculaire. Les fibres musculaires secrètent des chimio-attractants qui accélèrent et guident la pousse axonale du motoneurone vers leur cible. Une fois la jonction neuromusculaire établie, des facteurs trophiques sont secrétés par la fibre musculaire assurant la survie du motoneurone et des facteurs de stabilisation de la jonction neuromusculaire sont secrétés par le motoneurone telle que la protéine Agrine (Jacquier et al⁶¹ annexe 5). De ce fait, la co-culture de motoneurones avec des myotubes permet d'améliorer la maturité des deux types cellulaires par le jeu de bénéfices mutuels. Dans mes co-cultures, j'ai noté non seulement une maturation des myoblastes en myotubes plus rapide mais également une formation d'agrégats de récepteur de l'acétylcholine (AChR) plus importante et une maturation des MNs plus rapide.

c. Jonction NeuroMusculaire

La co-culture de motoneurones avec des myotubes permet d'obtenir des jonctions neuromusculaires (NMJ) *in vitro*, qui sont par nature impossibles à générer en monoculture. Un tel modèle pourrait permettre l'analyse des JNM dans le contexte de syndromes myasthéniques, qu'ils soient héréditaires (Jacquier et al⁶²) ou acquis (auto-immuns). La majorité de ces syndromes est due à la présence d'anticorps auto-immuns ciblant des constituants de la JNM. Environ 10% des myasthénies est d'origine génétique. La variabilité des symptômes et leur recouvrement entre les formes auto-immunes et génétiques rendent les différentes formes de la maladie difficiles à distinguer sur la base de l'examen clinique et le recours à des tests biologiques est nécessaire. Le dispositif de co-culture que nous sommes en train de développer pourrait permettre en un seul test de détecter la présence d'anticorps dirigés contre la JNM dans le sérum des patients. À noter que la difficulté à identifier la présence d'autoanticorps est également préjudiciable aux patients atteints d'une forme génétique de myasthénie. Comme la présence d'autoanticorps doit être exclue avant d'envisager un séquençage pour ces patients, le manque de tests complets ralentit considérablement l'accès au séquençage et donc au diagnostic pour ces patients. Enfin, au-delà des myasthénies, les syndromes de fatigabilité et de faiblesse musculaire sont très fréquents et il serait souvent utile de pouvoir exclure rapidement une myasthénie pour progresser dans l'identification de la pathologie sous-jacente.

C. Puces en silicone

Nos modèles de co-cultures en 2D ou 3D peuvent encore être améliorés par des dispositifs tel que les puces microfluidiques en silicone. Ces puces permettent de séparer 2 compartiments par des canaux suffisamment fins pour empêcher le passage des corps cellulaires, tout en laissant passer des axones. Il est ainsi possible de séparer physiquement les MNs et les myotubes dans deux compartiments distincts séparés par des canaux qui laissent passer les axones pour qu'ils forment des JMN dans le compartiment musculaire, un peu comme ce qui se passe *in vivo* entre la moelle épinière et les muscles. Un autre avantage de ce système est qu'il permet d'orienter un réseau d'axones, ce qui permettra de réaliser des suivis de transport axonal antérograde et rétrograde par des marqueurs vitaux ou des transfections de protéines de fusion fluorescentes. De plus, ces puces sont compatibles avec les marquages par immunofluorescence, ce qui rend possible l'analyse de cellules fixées dans les puces.

Le but final de l'utilisation de ce dispositif serait de combiner la culture des sphéroïdes comportant MN et Schwann d'un côté des puces et de l'autre les myoblastes différenciés en myotubes. Ce modèle complexe de tri-culture permettrait d'avoir un système très représentatif du système nerveux moteur périphérique. Cela permettrait de tester l'efficacité de traitements pour certaines pathologies neuronales, de tester la toxicité de molécules ou bien encore de développer des tests diagnostiques pour des pathologies telles que la recherche d'autoanticorps dans les maladies auto-immunes du système neuromusculaire (Guillain Barré, Myasthénie grave). Pour les études post génomiques, la possibilité d'utiliser ce type de modèle pour la caractérisation de nouveaux variants pourrait mettre en évidence des phénotypes non visualisables en monoculture comme par exemple la visualisation de la démyélinisation, la diminution du nombre de JNM ou un transport axonal altéré.

D. Modèle de la CMT2cc

Concernant le projet de caractérisation des variants pathogènes de NEFH, le modèle cellulaire développé et les différents marquages n'ont pas mis en évidence les agrégats périnucléaires ou axonaux prédits par la surexpression dans des cellules SH-EP⁴. La recherche de ces agrégats dans les lignées iPS issues de patients ou dans les lignées mutantes générées par CRISPR n'a pas permis d'en visualiser dans les cultures à J24. Il n'est pas exclu que les agrégats apparaissent plus tardivement dans les cultures. En effet, les 2 patients étudiés ont présenté des symptômes après l'âge de 20 ans et les motoneurones en culture ne sont peut-être pas suffisamment matures à J24 pour mettre en évidence des agrégats. Il a été montré dans d'autres modèles cellulaires de CMT2 (Jonas Van Lent 2021⁶³) qu'il fallait attendre 50 jours de différenciation pour voir un phénotype apparaître. Dans cet article, les auteurs ont mis en évidence une diminution du trafic mitochondrial lié à l'organisation du cytosquelette et une modification de la forme des mitochondries. La première perspective est donc de maintenir les cultures des différentes lignées pendant 50 jours et de réaliser à nouveau les marquages en immunofluorescence.

L'analyse protéique de NF-H par western blot a montré une augmentation des formes non phosphorylées et phosphorylées de la protéine NF-H pour la différenciation n°1. Cependant, les résultats de la seconde différenciation n'ont pas confirmé ces résultats. Malgré ces résultats discordants, les résultats de la différenciation n°1 concordent avec la littérature qui a décrit une compensation de la diminution de NF-H par NF-M pour la croissance axonale (Rao et al., 1998)⁵¹. Dans notre cas, les cellules pourraient produire plus de protéines NF-H pour compenser un défaut de localisation ou de fonctionnalité. De plus, dans leur article, Rao et al. ont montré que la diminution ou l'absence de NF-H induisait une augmentation de microtubules dans les motoneurones moteurs. L'extrémité C-terminale de la protéine NF-H est en interaction avec les microtubules, ce qui permet de stabiliser le réseau de microtubules^{44,50}. La quantification de l' α -tubuline dans les extraits protéiques que nous avons réalisée par western blot a montré une augmentation de la quantité d' α tubuline dans les lignées patients hétérozygotes et homozygotes de la différenciation n°1, ce qui correspond également aux résultats publiés⁴⁴. Sur la base des résultats de Rao et al.⁵¹ et des nôtres, on peut émettre l'hypothèse que des perturbations du réseau de neurofilaments affectent

l'expression de leurs constituants. D'autre part, ces différents résultats suggèrent que les interactions entre microtubules et NF-H mutées pourraient être réduites, ce qui déstabiliserait le réseau de microtubules et causerait l'augmentation de la quantité de tubuline. Afin de vérifier ces résultats, il faudrait réaliser une immunoprécipitation de NF-H pour vérifier si la protéine NF-H et les microtubules interagissent moins dans les lignées de patients que dans les lignées contrôles.

Grâce aux résultats de transcriptomique, des gènes significativement régulés entre les lignées de patients et les lignées contrôles ont pu être identifiés à des temps de culture précoces ou aucun phénotype cellulaire flagrant n'est observé. Six gènes (DRGX, PHOX2A, FGF10, TBX3, B3GAT2, STXBP6) sont donc à investiguer pour comprendre comment leur niveau d'expression intervient dans la pathologie. Dans un premier temps, nous allons vérifier ces variations d'expression dans de nouvelles différenciations par QRT-PCR. De plus, nous allons tester en immunofluorescence ou western blot des anticorps dirigés contre les gènes validés par QRT-PCR et possédant une expression suffisamment importante.

D'autres perspectives sont à l'étude pour améliorer la compréhension des mécanismes physiopathologiques associés aux variants dont la pathogénicité n'est pas avérée. La quantification de la neurodégénérescence dans les cultures, le développement d'un modèle de culture de motoneurones lombaires (motoneurones atteints le plus précocement dans la CMT2CC) ou le développement d'un modèle de neurones sensitifs font partie des voies en cours d'exploration.

Afin de quantifier la dégénérescence axonale, nous voulons mettre en place un test de détection par ELISA pour doser la quantité de neurofilaments légers et moyens (NF-L ou NF-M) dans les milieux de culture. A l'heure actuelle, le dosage de ces neurofilaments dans le liquide céphalorachidien ou dans le sang⁶⁴⁻⁶⁶ est utilisé comme marqueur de dégénérescence axonale dans des pathologies neurodégénératives telles que la sclérose latérale amyotrophique⁶⁴. Nous avons réalisé des essais de dosage par ELISA de NF-L et NF-M dans le milieu de culture. Les résultats préliminaires obtenus

sur un autre projet montrent qu'il est possible de réaliser le dosage des neurofilaments dans les milieux mais nous avons besoin de rationaliser les résultats par rapport au nombre de cellules et de faire des essais à différents temps de culture pour établir le dosage. Ce test pourrait permettre de quantifier la perte axonale dans nos cultures entre les lignées de patients et les lignées contrôles (pour le projet NF-H notamment)

Mouilleau et al ont publié en 2020⁴⁹ un article qui décrit la spécification des sous types de motoneurones. Cet article montre qu'il est possible, en modulant la concentration et la date d'ajout de certains facteurs (notamment l'acide rétinoïque) et en ajoutant du FGF2 à un moment précis, de produire des motoneurones lombaires à partir d'iPS. Le CMT étant une neuropathie distale affectant les MN à longs axones en premier, il serait sans doute pertinent d'étudier cette pathologie dans le type de motoneurones fournissant les axones les plus longs.

La CMT atteint la fonction motrice mais également la fonction sensitive. Afin de pouvoir compléter les modèles du laboratoire, le développement d'un modèle *in vitro* de neurones sensitifs constituerait également un outil supplémentaire de choix pour la compréhension de cette pathologie.

VII. Références biblio

1. Benquey, T. *et al.* A National French Consensus on Gene List for the Diagnosis of Charcot-Marie-Tooth Disease and Related Disorders Using Next-Generation Sequencing. *Genes (Basel)* **13**, 318 (2022).
2. Cortese, A. *et al.* Targeted next-generation sequencing panels in the diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology* **94**, e51–e61 (2020).
3. Rebelo, A. P. *et al.* Cryptic Amyloidogenic Elements in the 3' UTRs of Neurofilament Genes Trigger Axonal Neuropathy. *The American Journal of Human Genetics* **98**, 597–614 (2016).
4. Jacquier, A. *et al.* Cryptic amyloidogenic elements in mutant NEFH causing Charcot-Marie-Tooth 2 trigger aggregates formation and neuronal death. *acta neuropathol commun* **5**, 55 (2017).
5. Pipis, M. *et al.* Charcot-Marie-Tooth disease type 2CC due to NEFH variants causes a progressive, non-length-dependent, motor-predominant phenotype. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **93**, 48–56 (2022).
6. Boillée, S. *et al.* Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science* **312**, 1389–1392 (2006).
7. Nagai, M. *et al.* Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons. *Nat Neurosci* **10**, 615–622 (2007).
8. Jessen, K. R., Mirsky, R. & Lloyd, A. C. Schwann Cells: Development and Role in Nerve Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a020487 (2015).
9. Darnell, D. & Gilbert, S. F. Neuroembryology. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **6**, 10.1002/wdev.215 (2017).

10. Catala, M. & Kubis, N. Chapter 3 - Gross anatomy and development of the peripheral nervous system. in *Handbook of Clinical Neurology* (eds. Said, G. & Krarup, C.) vol. 115 29–41 (Elsevier, 2013).
11. Hanani, M. & Verkhratsky, A. Satellite Glial Cells and Astrocytes, a Comparative Review. *Neurochem Res* **46**, 2525–2537 (2021).
12. Chauvet, S., Dessaud, E. & de Lapeyrière, O. [Molecular mechanisms leading to spinal motoneurons specialization in vertebrates]. *Med Sci (Paris)* **20**, 135–139 (2004).
13. Soendenbroe, C., Andersen, J. L. & Mackey, A. L. Muscle-nerve communication and the molecular assessment of human skeletal muscle denervation with aging. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **321**, C317–C329 (2021).
14. Letournel, F. La sous-unité lourde des neurofilaments (NFH): du gène à la pathologie. 192.
15. Slater, C. R. The Structure of Human Neuromuscular Junctions: Some Unanswered Molecular Questions. *Int J Mol Sci* **18**, 2183 (2017).
16. Dong, Z. *et al.* Neu differentiation factor is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat schwann cell precursors. *Neuron* **15**, 585–596 (1995).
17. Bosch-Queralt, M., Fledrich, R. & Stassart, R. M. Schwann cell functions in peripheral nerve development and repair. *Neurobiology of Disease* **176**, 105952 (2023).
18. Salzer, J. L. Schwann Cell Myelination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a020529 (2015).
19. Osseni, A. Un lien entre les triades et les microtubules dans la cellule musculaire : Rôle de la triadine et de CLIMP-63. (2015).

20. Bergua, C. Pathogénicité des auto-anticorps anti-SRP et anti-HMGCR au cours des myopathies nécrosantes auto-immunes. (2017).
21. Trovato, F., Imbesi, R., Conway, N. & Castrogiovanni, P. Morphological and Functional Aspects of Human Skeletal Muscle. *Journal of Functional Morphology and Kinesiology* **1**, 289–302 (2016).
22. Skre, H. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin Genet* **6**, 98–118 (1974).
23. Rossor, A. M., Tomaselli, P. J. & Reilly, M. M. Recent advances in the genetic neuropathies. *Curr Opin Neurol* **29**, 537–548 (2016).
24. Pareyson, D. & Marchesi, C. Diagnosis, natural history, and management of Charcot-Marie-Tooth disease. *Lancet Neurol* **8**, 654–667 (2009).
25. Maladie de Charcot-Marie-Tooth. *AFM-Téléthon* <https://www.afm-telethon.fr/maladie-charcot-marie-tooth-1172> (2020).
26. Berciano, J. *et al.* Intermediate Charcot–Marie–Tooth disease: an electrophysiological reappraisal and systematic review. *J Neurol* **264**, 1655–1677 (2017).
27. Pisciotta, C. & Shy, M. E. Chapter 42 - Neuropathy. in *Handbook of Clinical Neurology* (eds. Geschwind, D. H., Paulson, H. L. & Klein, C.) vol. 148 653–665 (Elsevier, 2018).
28. Pipis, M., Rossor, A. M., Laura, M. & Reilly, M. M. Next-generation sequencing in Charcot–Marie–Tooth disease: opportunities and challenges. *Nat Rev Neurol* **15**, 644–656 (2019).
29. Bird, T. D. Charcot-Marie-Tooth Hereditary Neuropathy Overview. in *GeneReviews®* (eds. Adam, M. P. *et al.*) (University of Washington, Seattle, 1993).

30. Pipis, M. *et al.* Charcot-Marie-Tooth disease type 2CC due to NEFH variants causes a progressive, non-length-dependent, motor-predominant phenotype. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* (2021) doi:10.1136/jnnp-2021-327186.
31. Nam, D. E. *et al.* Axonal Charcot-Marie-Tooth neuropathy concurrent with distal and proximal weakness by translational elongation of the 3' UTR in NEFH. *J Peripher Nerv Syst* **22**, 200–207 (2017).
32. Balzeau, J. Utilisation de peptides dérivés des filaments intermédiaires pour leurs propriétés antitumorales et de ciblage des cellules de gliome. (2013).
33. Liu, Q. *et al.* Neurofilament proteins in neurodegenerative diseases. *Cell Mol Life Sci* **61**, 3057–3075 (2004).
34. Shelanski, M. L. & Liem, R. K. H. Neurofilaments. *Journal of Neurochemistry* **33**, 5–13 (1979).
35. Lee, M. K. & Cleveland, D. W. Neuronal intermediate filaments. *Annu Rev Neurosci* **19**, 187–217 (1996).
36. Laser-Azogui. Neurofilament assembly and function during neuronal development. *Current Opinion in Cell Biology* **32**, 92–101 (2015).
37. Pant, H. C., Veeranna, null & Grant, P. Regulation of axonal neurofilament phosphorylation. *Curr Top Cell Regul* **36**, 133–150 (2000).
38. Perrot, R., Eyer, J. & Dermietzel, R. *Neurofilaments: Properties, Functions, and Regulation - Springer*. vol. 79 171 (Humana Press, 2013).
39. Walker, K. L., Yoo, H. K., Undamatla, J. & Szaro, B. G. Loss of neurofilaments alters axonal growth dynamics. *J Neurosci* **21**, 9655–9666 (2001).
40. Kriz, J., Zhu, Q., Julien, J. P. & Padjen, A. L. Electrophysiological properties of axons in mice lacking neurofilament subunit genes: disparity between conduction velocity and axon diameter in absence of NF-H. *Brain Res* **885**, 32–44 (2000).

41. Yuan, A., Rao, M. V., Veeranna & Nixon, R. A. Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **9**, a018309 (2017).
42. Kong, J., Tung, V. W., Aghajanian, J. & Xu, Z. Antagonistic roles of neurofilament subunits NF-H and NF-M against NF-L in shaping dendritic arborization in spinal motor neurons. *J Cell Biol* **140**, 1167–1176 (1998).
43. Gotow, T. Neurofilaments in health and disease. *Med Electron Microsc* **33**, 173–199 (2000).
44. Zhu, Q., Lindenbaum, M., Levavasseur, F., Jacomy, H. & Julien, J. P. Disruption of the NF-H gene increases axonal microtubule content and velocity of neurofilament transport: relief of axonopathy resulting from the toxin beta,beta'-iminodipropionitrile. *J Cell Biol* **143**, 183–193 (1998).
45. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
46. Maury, Y. *et al.* Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes. *Nature Biotechnology* **33**, 89–96 (2015).
47. Perrimon, N., Pitsouli, C. & Shilo, B.-Z. Signaling Mechanisms Controlling Cell Fate and Embryonic Patterning. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, a005975 (2012).
48. Faye, P.-A. *et al.* Optimized Protocol to Generate Spinal Motor Neuron Cells from Induced Pluripotent Stem Cells from Charcot Marie Tooth Patients. *Brain Sci* **10**, (2020).

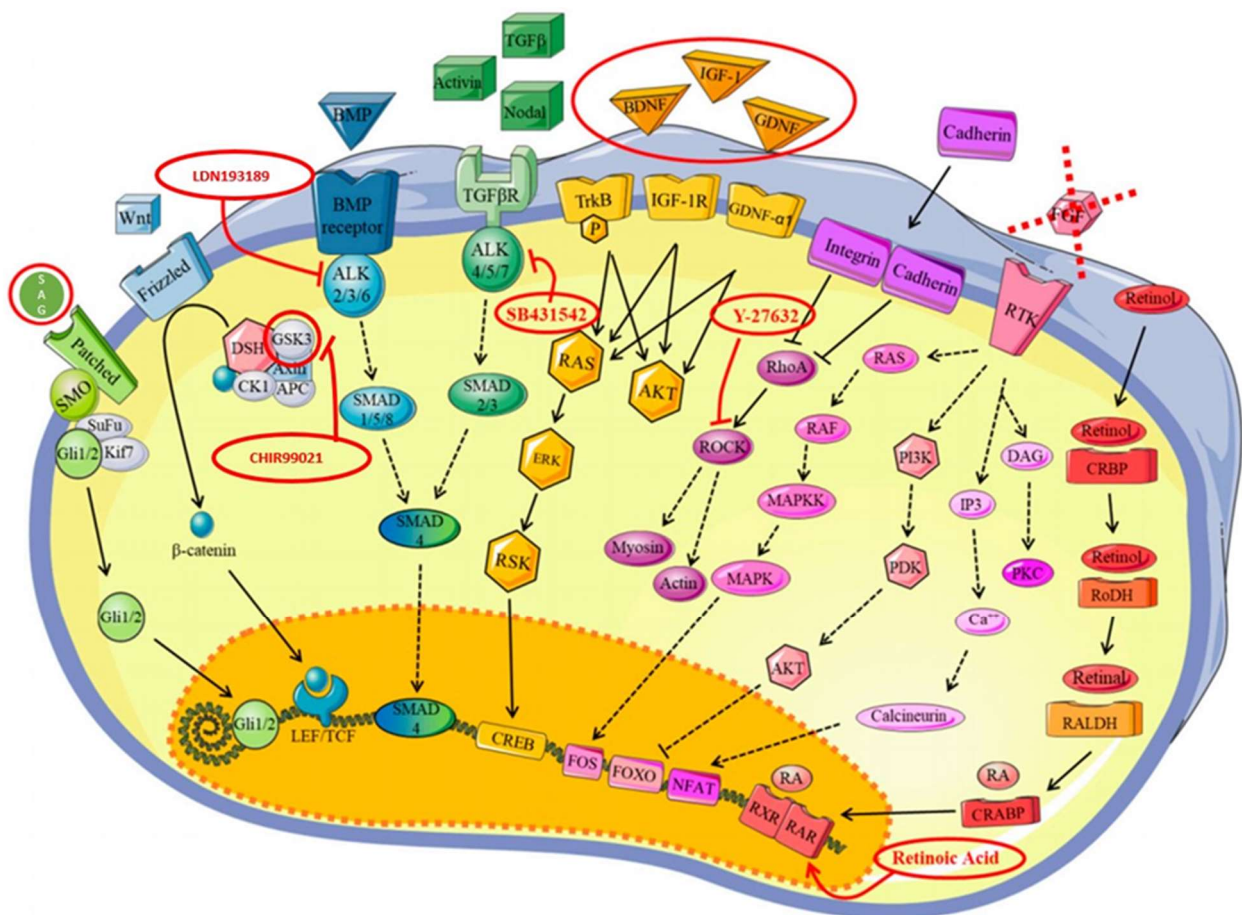
49. Mouilleau, V. *et al.* Dynamic extrinsic pacing of the HOX clock in human axial progenitors controls motor neuron subtype specification. *bioRxiv* 2020.06.27.175646 (2020) doi:10.1101/2020.06.27.175646.
50. Besser, R. R. *et al.* Enzymatically crosslinked gelatin-laminin hydrogels for applications in neuromuscular tissue engineering. *Biomater Sci* **8**, 591–606 (2020).
51. Rao, M. V. *et al.* Neurofilament-dependent Radial Growth of Motor Axons and Axonal Organization of Neurofilaments Does Not Require the Neurofilament Heavy Subunit (NF-H) or Its Phosphorylation. *Journal of Cell Biology* **143**, 171–181 (1998).
52. Rossaert, E. & Van Den Bosch, L. HDAC6 inhibitors: Translating genetic and molecular insights into a therapy for axonal CMT. *Brain Research* **1733**, 146692 (2020).
53. Saito, T., Greenwood, A., Sun, Q. & Anderson, D. J. Identification by differential RT-PCR of a novel paired homeodomain protein specifically expressed in sensory neurons and a subset of their CNS targets. *Mol Cell Neurosci* **6**, 280–292 (1995).
54. Pattyn, A., Goridis, C. & Brunet, J. F. Specification of the central noradrenergic phenotype by the homeobox gene Phox2b. *Mol Cell Neurosci* **15**, 235–243 (2000).
55. Nakano, M. *et al.* Homozygous mutations in ARIX(PHOX2A) result in congenital fibrosis of the extraocular muscles type 2. *Nat Genet* **29**, 315–320 (2001).
56. Umemori, H., Linhoff, M. W., Ornitz, D. M. & Sanes, J. R. FGF22 and its close relatives are presynaptic organizing molecules in the mammalian brain. *Cell* **118**, 257–270 (2004).
57. Lin, L. F., Doherty, D. H., Lile, J. D., Bektesh, S. & Collins, F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* **260**, 1130–1132 (1993).

58. Scales, S. J., Hesser, B. A., Masuda, E. S. & Scheller, R. H. Amisyn, a Novel Syntaxin-binding Protein That May Regulate SNARE Complex Assembly *. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 28271–28279 (2002).
59. Khan, S. F. *et al.* The roles and regulation of TBX3 in development and disease. *Gene* **726**, 144223 (2020).
60. Jacquier, A. *et al.* Homozygous COQ7 mutation: a new cause of potentially treatable distal hereditary motor neuropathy. *Brain* awac453 (2022) doi:10.1093/brain/awac453.
61. Jacquier, A. *et al.* Severe congenital myasthenic syndromes caused by agrin mutations affecting secretion by motoneurons. *Acta Neuropathol* **144**, 707–731 (2022).
62. Jacquier, A. *et al.* Expanding the phenotypic variability of MORC2 gene mutations: From Charcot-Marie-Tooth disease to late-onset pure motor neuropathy. *Hum Mutat* (2022) doi:10.1002/humu.24445.
63. Van Lent, J. *et al.* Induced pluripotent stem cell-derived motor neurons of CMT type 2 patients reveal progressive mitochondrial dysfunction. *Brain* **144**, 2471–2485 (2021).
64. Falzone, Y. M. *et al.* Serum phosphorylated neurofilament heavy-chain levels reflect phenotypic heterogeneity and are an independent predictor of survival in motor neuron disease. *J Neurol* **267**, 2272–2280 (2020).
65. Heckler, I. & Venkataraman, I. Phosphorylated neurofilament heavy chain: a potential diagnostic biomarker in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurophysiol* **127**, 737–745 (2022).
66. Steinacker, P. *et al.* Neurofilaments in the diagnosis of motoneuron diseases: a prospective study on 455 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **87**, 12–20 (2016).

VIII. Annexes

Annexe 1 : Représentation schématique des facteurs trophiques (cercles rouges) utilisés pour la différenciation des motoneurones dans cette étude et les voies de signalisations affectées.

Voie Sonic Hedgehog (Shh) en vert ; voie Wnt en bleu clair ; voie BMP (morphogènes protéines morphogénétiques osseuses) en bleu foncé ; voie du facteur de croissance transformant- β (TGF- β) ; les voies du BDNF (facteur neurotrophique dérivé du cerveau), de l'IGF-1 (facteur de croissance analogue à l'insuline) et du GDNF (facteur neurotrophique dérivé de la lignée cellulaire gliale) en jaune ; la voie de l'inhibiteur de Rock en violet ; la voie du FGF2 (facteurs de croissance des fibroblastes) en rose ; la voie de l'acide rétinoïque en rouge. Schéma modifié à partir de Faye et al., 2020⁴⁸



| | | |
|--|---|---------------------------|
| | Julien CARRAS Equipe Nerve-Muscle Interactions (Dr. L. Schaeffer) | Version: 01 du 05/04/2023 |
| PROTOCOLE DE DIFFÉRENCIATION IPS EN MOTONEURONES | | |

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|----|
| MATÉRIEL | 2 |
| FACTEURS | 3 |
| ANTICORPS | 3 |
| PREPARATION DU MILIEU NEURONAL DE BASE | 4 |
| RECONSTITUTION DES FACTEURS | 4 |
| Schéma de la culture :..... | 5 |
| Tableaux des différents milieux :..... | 6 |
| Différenciation IPS en progéniteurs MOTONEURONES J0 | 7 |
| Différenciation IPS en progéniteurs MOTONEURONES J2 | 7 |
| Différenciation IPS en progéniteurs MOTONEURONES J4 | 8 |
| Différenciation IPS en progéniteurs MOTONEURONES J6-J7 | 8 |
| Différenciation IPS en progéniteurs MOTONEURONES J8 | 9 |
| PREPARATION DU COATING PO-LAM | 9 |
| Pour la décongélation :..... | 10 |
| MOTONEURONES J11 : changement MILIEU ET CONTRÔLE QUALITE PROGENITEURS | 11 |
| (marqueur OLIG2+) | 11 |
| MOTONEURONES J14 ET PLUS : CHANGEMENT DE MILIEU ET CONTROLE QUALITE MN (marqueur ISL1+) | 12 |

| | | |
|---|--|---------------------------|
| | <p>Julien CARRAS Equipe Nerve-Muscle Interactions (Dr. L. Schaeffer)</p> | Version: 01 du 05/04/2023 |
| PROTOCOLE DE DIFFÉRENCIATION IPS EN MOTONEURONES | | |

MATÉRIEL

| PRODUIT | FOURNISSEUR | RÉFÉRENCE |
|-------------------|--------------------------|-----------|
| PBS | SIGMA | D8537 |
| DMEM/F12 | Invitrogen | 31331028 |
| Neurobasal medium | Invitrogen | 21103049 |
| Glutamax | Thermo fisher | 35050061 |

| | | |
|--|--------------------------|--------------|
| B27 supplément, sans Vit A - 50X | Invitrogen | 12587010 |
| N2 supplement , 100X | Invitrogen | 17502048 |
| β -Mercapto Ethanol | Thermo fisher | 31350010 |
| Pénicilline-Streptomycine | Invitrogen | 15140122 |
| UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water | Invitrogen | 10977035 |
| BSA | SIGMA | A9647-50G |
| TRITON | SIGMA | T8787-100mL |
| DMSO | SIGMA | D2850-5X10ML |

PROTOCOLE DE DIFFÉRENCIATION IPS EN MOTONEURONES

FACTEURS

| PRODUIT | FOURNISSEUR S | RÉFÉRENCE | Stock | Dilution | Cf. |
|------------------|---------------|-----------|--------|----------|----------|
| Y-27632 | Tocris | 1254 | 10 mM | - | 10 µM |
| Chir99021 | tocris | 4423 | 3mM | | 3µM |
| SB431542 | tocris | 1614 | 20mM | | 20µM |
| LDN193189 | ceprocell | 04-0074 | 100µM | | 0.1µM |
| RA | SIGMA | R2625 | 10 mM | 10 µM | 0.1 µM |
| SAG | SIGMA | 566660 | 1 mM | - | 0.5 µM |
| BDNF | Peprotech | 450-02 | 100 µM | 10 µg/ml | 10 ng/ml |
| GDNF | Peprotech | 450-13 | 100 µM | 10 µg/ml | 10 ng/ml |
| DAPT | TOCRIS | 2634 | 10 mM | - | 10 µM |
| Poly-L-Ornithine | SIGMA | P4957 | - | - | 1/8 |
| Laminine | Invitrogen | L2020 | - | - | 1/500 |
| PFA | Euromedex | 15710 | 16% | - | 8% |
| 5FDU | Merck | (343333) | | | 40µM |

ANTICORPS

| PRODUIT | FOURNISSEURS | RÉFÉRENCE | Dilution |
|----------------------|--------------|-------------|----------|
| Islet1 | R&D Systems | AF1837 | 1/500 |
| Olig2 | Millipore | AB9610 | 1/200 |
| Tuj1 | Biologend | 801202 | 1/1000 |
| NEFH - Smi32 | Biologend | BLE801701 | 1/1000 |
| p NF H sm31 mouse | Biologend | BLE801602 | 1/1000 |
| Alexa 488 Dk-anti-Ms | Invitrogen | A21202 | 1/1000 |
| Alexa 488 Dk-anti-Rb | Invitrogen | A21206 | 1/1000 |
| Alexa 555 Dk-anti-Ms | Invitrogen | A31570 | 1/1000 |
| Alexa 555 Dk-anti-Gt | Invitrogen | A21432 | 1/1000 |
| Alexa 555 Dk-anti-Rb | Invitrogen | A31572 | 1/1000 |
| 647 Dk-anti-Ms | Jackson Lab | 715-606-151 | 1/1000 |
| Alexa 647 Dk-anti-Rb | Invitrogen | A31574 | 1/1000 |
| Alexa 647 Dk-anti-Gt | Invitrogen | A21447 | 1/1000 |

PROTOCOLE DE DIFFÉRENCIATION IPS EN MOTONEURONES

PREPARATION DU MILIEU NEURONAL DE BASE

| MILIEU NEURONAL DE BASE |
|---|
| DMEM/F12 : Neurobasal (50:50) |
| B27 supplement 50X |
| N2 supplement 100X |
| PS (1000X) |
| β -ME 0.05 mM (stock: 50 mM, 1000X) |
| Glutamax 10X |

Le milieu se conserve un mois à +4°C à l'abri de la lumière.

RECONSTITUTION DES FACTEURS

- RA (à conserver dans tube opaque) :

Faire STOCK 1 à 100 ~~mM~~, 100 mg dans 3.32 ml DMSO

Faire STOCK 2 à 10mM = 100 μ l de STOCK 1 + 900 μ l DMSO

Faire STOCK 3 à 1mM = 100 μ l de STOCK 2 + 900 μ l DMSO

Faire STOCK 4 à 100 μ M = 100 μ l de STOCK 2 + 900 μ l DMSO

Utilisation stock 4 par dilution 1/1000 dans le milieu neuronal de base pour avoir 100~~mM~~ final.

- CHIR99021

10 mg dans 7.160 μ l DMSO pour avoir stock à 3mM.

Utilisation au 1/1000 dans le milieu neuronal de base pour avoir 3 μ M final.

- SAG :

1 mg dans 3.8 μ l DMSO pour avoir stock à 500 μ M.

Utilisation au 1/1000 dans le milieu neuronal de base pour avoir 500 ~~mM~~ final.

- SB431542

10 mg dans 1.3 μ l DMSO pour avoir stock à 20 μ M.

Utilisation au 1/1000 dans le milieu neuronal de base pour avoir 20 ~~mM~~ final.

- LDN1931189

Faire STOCK 1 (10mM) = 2 mg dans 451.5 μ l DMSO pour avoir stock à 10 ~~mM~~.

Faire STOCK 2 (1mM) = 50 μ l STOCK 1 + 450 μ l DMSO

Faire STOCK 3 (100 μ M) = 50 μ l STOCK 2 + 450 μ l DMSO

Utilisation au 1/1000 dans le milieu neuronal de base pour avoir 0.1 μ M final.

- DAPT :

10 mg dans 2.3 ml DMSO pour avoir stock à 10 μ M.

Utilisation au 1/1000 dans le milieu neuronal de base pour avoir 10 ~~mM~~ final.

- BDNF :

100 μ g dans 1 ml eau ultra pure pour avoir stock 1 à 100 μ g/ml (10mM).

Dilution du stock 1 au 1/10 avec PBS/BSA 0.1% (filtré) : 100 μ L stock 1 + 900 μ L PBS/BSA pour avoir du stock 2 à 10 μ g/ml (1 mM).

PROTOCOLE DE DIFFÉRENCIATION IPS EN MOTONEURONES

Utilisation du stock 2 au 1/1000 dans le milieu neuronal de base pour avoir 10 ng/mL final.

• GDNF :

100 µg dans 1 ml eau ultra pure pour avoir stock 1 à 100 µg/mL (10mM).

Dilution du stock 1 au 1/10 avec PBS/BSA 0.1% (filtré) : 50 µL stock 1 + 450 µL PBS/BSA pour avoir du stock 2 à 10 µg/mL (1mM).

Utilisation du stock 2 au 1/1000 dans le milieu neuronal de base pour avoir 10 ng/mL final.

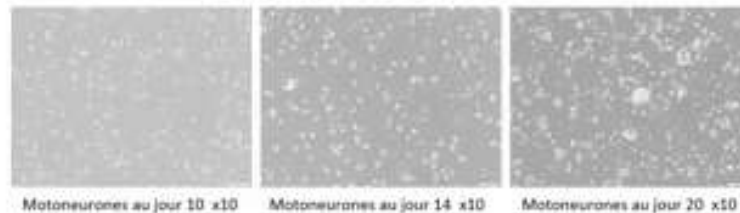
SCHEMA DE LA CULTURE :



Culture en sphéroïdes de J0 à J9 :



Culture 2D de J10 à J20 :



PROCOLE DE DIFFÉRENCIATION IPS EN MOTONEURONES

TABLEAUX DES DIFFERENTS MILIEUX :

| MILIEU DE BASE | | IPS -> PROG | | PROG-> MN Mature | |
|--------------------------------|--------|-------------------|--------|------------------|--------|
| Reactifs | Volume | Milieu #1 | Volume | Milieu #10 | Volume |
| NEUROBASAL medium | 250ml | MNB | 20ml | MNB | 20ml |
| DMEM/F12 | 250ml | Y-27632 [10mM] | 20µl | Y-27632 [10mM] | 20µl |
| Glutamax | 2.5ml | SB431542 [20mM] | 20µl | BDNF | 20µl |
| B27supplement, minus Vit A 50X | 10ml | LDN193189 [100µM] | 20µl | RA [100µM] | 20µl |
| N2 supplement, 100X | 5ml | CH809021 [3mM] | 20µl | SAG [500µM] | 20µl |
| 2-Mercaptoethanol (50 mM) | 3.25ml | | | DAPT [3mM] | 20µl |
| F/S optionnel | 2.5ml | | | | |
| | | Milieu #2 | Volume | Milieu #11 | Volume |
| | | MNB | 20ml | MNB | 20ml |
| | | SB431542 [20mM] | 20µl | BDNF [10µg/ml] | 20µl |
| | | LDN193189 [100µM] | 20µl | GDNF | 20µl |
| | | CH809021 [3mM] | 20µl | RA [1mM] | 20µl |
| | | RA [100µM] | 20 µl | SAG [500µM] | 20µl |
| | | SAG [500µM] | 20µl | DAPT [3mM] | 20µl |
| | | | | SFDFU | 100µl |
| | | Milieu #4 | Volume | Milieu #14 ... | Volume |
| | | MNB | 20ml | MNB | 20ml |
| | | SB431542 [20mM] | 20µl | BDNF [10µg/ml] | 20µl |
| | | LDN193189 [100µM] | 20µl | GDNF [10µg/ml] | 20µl |
| | | RA [100µM] | 20µl | | |
| | | SAG [500µM] | 20µl | | |
| | | Milieu #6 et #8 | Volume | | |
| | | MNB | 20ml | | |
| | | BDNF [10µg/ml] | 20µl | | |
| | | RA [100µM] | 20µl | | |
| | | SAG [500µM] | 20µl | | |

PROTOCOLE DE DIFFÉRENCIATION IPS EN MOTONEURONES

DIFFERENCIATION IPS EN PROGENITEURS MOTONEURONES J0

- Préparer le milieu J0 selon le tableau ci-dessous :

| MILIEU NEURONAL DE BASE | SUPPLÉMENTS |
|---|--------------------------------------|
| DMEM/F12 : Neurobasal (50:50) | Y27 10 μ M (stock 10 mM, 1000X) |
| B27 supplement 50X | SB431542 (stock 20 mM, 1000X) |
| N2 supplement 100X | LDN193189 (stock 100 μ M, 1000X) |
| PS (1000X) | CHIR99021 (stock 3 mM, 1000X) |
| β -ME 0.05 mM (stock: 50 mM, 1000X) | |
| - | |

- 1h avant, renouveler le milieu de culture PSC BREW +Rock inhibiteur
- Préparer le milieu MNB J0 et mettre à 37°C
- Récupérer le milieu de la B60 dans un tube de 15ml
- Faire un lavage avec TrypLE
- Remettre un fond de TrypLE (1,5 ml pour T75 et 0,5ml pour B60)
- Incuber 3 à 4 min à 37°C
- Vérifier l'aspect des cellules
- Décoller doucement les cellules
- Reprendre un peu de milieu PSC ~~brew~~ et récupérer les cellules de la boite dans un tube de 15ml
- Récupérer un peu de suspension pour le comptage
- Centrifuger à 200g pdt 4min
- ~~Preparer~~ les boite avec coating anti adhérent solution (2ml par puits de plaque 6P)
- Réaliser le comptage à la malassez
- Reprendre le culot avec milieu J0 (idéalement 1M/ml)
- Ensemencer dans des plaque 6P préalablement coaté ULA à raison de 300 000 cellules par puits

DIFFERENCIATION IPS EN PROGENITEURS MOTONEURONES J2

- Préparer le milieu J2 selon le tableau ci-dessous :

| MILIEU NEURONAL DE BASE | SUPPLÉMENTS |
|-------------------------------|-------------------------------|
| DMEM/F12 : Neurobasal (50:50) | CHIR99021 (stock 3 mM, 1000X) |
| B27 supplement 50X | SB431542 (stock 20 mM, 1000X) |

| | | |
|---|--|---------------------------|
| Julien CARRAS Equipe Nerve-Muscle Interactions (Dr. L. Schaeffer) | | Version: 01 du 05/04/2023 |
| PROTOCOLE DE DIFFÉRENCIATION IPS EN MOTONEURONES | | |

| | |
|------------------------------------|---------------------------------|
| N2 supplément 100X | LDN193189 (stock 100 µM, 1000X) |
| PS (1000X) | RA 0.1 µM (stock: 10 mM, 1000X) |
| β-ME 0.05 mM (stock: 50 mM, 1000X) | SAG (stock: 500 µM, 1000X) |

- Minimum 30min avant, mettre le milieu MNB J2 dans bain marie sec à 37 ou la veille à TA
- Sortir les boîtes de l'incubateur
- Cette étape ~~depend~~ de la taille des EB :
 - Si petit : Pencher la boîte, récupérer avec une pipette de 5 ml. Transférer les EB dans un tube 15ml. Centrifuger 2min à 200g. Reprendre le culot dans MNB J+2 en faisant des aller-retours avec douceur à la pipette pour les remettre en suspension, puis répartir dans la plaque 6p en faisant attention d'avoir la même quantité dans chaque puits.
 - Si gros EB : Pencher la boîte, éliminer le surnageant avec P1000 et remettre 2ml de milieu MNB J2
- Incuber à 37° (bien ~~re~~-dispenser les EB en secouant en forme de croix)

DIFFERENCIATION IPS EN PROGENITEURS MOTONEURONES J4

- Préparer le milieu J4 selon le tableau ci-dessous :

| MILIEU NEURONAL DE BASE | SUPPLÉMENTS |
|------------------------------------|---------------------------------|
| DMEM/F12 : Neurobasal (50:50) | SAG (stock: 500 µM, 1000X) |
| B27 supplément 50X | SB431542 (stock 20 mM, 1000X) |
| N2 supplément 100X | LDN193189 (stock 100 µM, 1000X) |
| PS (1000X) | RA 0.1 µM (stock: 10 mM, 1000X) |
| β-ME 0.05 mM (stock: 50 mM, 1000X) | |

- Minimum 30min avant, mettre le milieu MNB J2 dans bain marie sec à 37 ou la veille à TA
- Sortir les boîtes de l'incubateur
- Pencher la boîte, éliminer le surnageant avec P1000 et remettre 2ml de milieu MNB J4
- Incuber à 37° (bien ~~re~~-dispenser les EB en secouant en forme de croix)

Remarque : Si beaucoup d'EB, possibilité de séparer en 2 plaques 6P pour éviter l'agrégation

DIFFERENCIATION IPS EN PROGENITEURS MOTONEURONES J6-J7

- Préparer le milieu J6 selon le tableau ci-dessous :

| MILIEU NEURONAL DE BASE | SUPPLÉMENTS |
|-------------------------------|----------------------------|
| DMEM/F12 : Neurobasal (50:50) | SAG (stock: 500 µM, 1000X) |

| | |
|---|---------------------------|
| Julien CARRAS Equipe Nerve-Muscle Interactions (Dr. L. Schaeffer) | Version: 01 du 05/04/2023 |
| PROTOCOLE DE DIFFÉRENCIATION IPS EN MOTONEURONES | |

| | |
|---|--|
| B27 supplement 50X | RA 0.1 μ M (stock: 10 mM, 1000X) |
| N2 supplement 100X | BDNF 10 ng/ mL (stock 2: 10 μ g/ mL , 1000X) |
| PS (1000X) | |
| β -ME 0.05 mM (stock: 50 mM, 1000X) | |

- Minimum 30min avant, mettre le milieu MNB J7 dans bain marie sec à 37 ou la veille à TA
 - Sortir les boites de l'incubateur
 - Pencher les plaques et attendre la sédimentation des EB.
 - Aspirer le maximum de milieu avec la P200 ou P1000
 - Remettre et 2ml dans plaque 6P
 - Incuber les cellules.
- Remarque : Si beaucoup d'EB, possibilité de séparer en 2 plaques 6P pour éviter l'agrégation

DIFFERENCIATION IPS EN PROGENITEURS MOTONEURONES J8

- Préparer le milieu J8 selon le tableau ci-dessous :

| MILIEU NEURONAL DE BASE | SUPPLÉMENTS |
|---|--|
| DMEM/F12 : Neurobasal (50:50) | SAG (stock: 500 μ M, 1000X) |
| B27 supplement 50X | RA 0.1 μ M (stock: 10 mM, 1000X) |
| N2 supplement 100X | BDNF 10 ng/ mL (stock 2: 10 μ g/ mL , 1000X) |
| PS (1000X) | |
| β -ME 0.05 mM (stock: 50 mM, 1000X) | |

- Minimum 30min avant, mettre le milieu MNB J7 dans bain marie sec à 37 ou la veille à TA
- Sortir les boites de l'incubateur
- Pencher les plaques et attendre la sédimentation des EB.
- Aspirer le maximum de milieu avec la P200 ou P1000
- Remettre et 2ml dans plaque 6P
- Incuber les cellules.

PREPARATION DU COATING PO-LAM

- 1- Diluer la Poly-L-Ornithine au 1/6^{ème} dans PBS, incuber 1 nuit à 37°C (6h peut être suffisant).
- 2- Rincer le coating 2-3 fois à l'eau ultra pure puis ajouter la Laminine (dilué 1/500^{ème} dans du PBS), incuber 1 nuit à 37°C (4h peut être suffisant).

Les ~~coatings~~ peuvent se conserver 1 semaine maximum à 4°C.

PROTOCOLE DE DIFFÉRENCIATION IPS EN MOTONEURONES

PASSAGE DES PROGENITEURS DE MOTONEURONES (J10) ou DECONGELATION DES PROGENITEURS DE MOTONEURONES (J9)

- Préparer le milieu J9 selon le tableau ci-dessous :

| MILIEU NEURONAL DE BASE | SUPPLÉMENTS |
|---|---|
| DMEM/F12 : Neurobasal (50:50) | RA 0.1 μ M (stock: 10 mM) (1 μ L ds 1mL F12 - 100X) |
| B27 supplément 50X | SAG 0.5 μ M (stock: 0.5 mM, 1000X) |
| N2 supplément 100X | BDNF 10 ng/ μ L (stock 2: 10 μ g/ μ L, 1000X) |
| PS (1000X) | GDNF 10 ng/ μ L (stock 2: 10 μ g/ μ L, 1000X) |
| β -ME 0.05 mM (stock: 50 mM, 1000X) | DAPT 10 μ M (stock: 10 μ M, 1000X) |
| - | Y 10 μ M (stock 10 mM, 1000X) |

- Minimum 30min avant, préparer le milieu MNB J9 dans bain marie sec à 37 ou la veille à TA
- Sortir les boîtes de l'incubateur et observation (voir ci-dessus)
- Récupérer les EB
- Centrifuger 4min à 100G ou 2 min à 200G
- Ajouter 0.5 à 1ml de ~~tryple~~ (ajuster en fonction du culot) et remettre en suspension le culot délicatement
- Incuber environ 10 min à 37°C en faisant des up and down toutes les 2 minutes.
- Préparer milieu DMEM + 2% FBS et reprendre les cellules avec 2X le volume de ~~Tryple~~.
- Pour éliminer l'ADN : 2 possibilités :
 - Centrifuger 4min à 100G ou 2 min à 200G, éliminer le suragant puis reprendre avec 0.8 ml (pour un pull de 4 puits) PBS + ~~DNase~~ (DNase au 1mg/ml diluée au 1/50 : 200 μ g/ml), dissocier par aspire/refoule jusqu'à la pelote soit dissoute.
 - Soit Filtrer en 100 μ idéalement ; fonctionne également en 70 μ (conserve mieux les cellules).
- Centrifuger 4min à 100G ou 2 min à 200G
- Reprendre le culot cellulaire avec le MNB J9
- ensemencer 30-20 000 à cellules/cm2 et possibilité de congeler le reste en CS10.

POUR LA DECONGELATION :

- Préparer le milieu J9 selon le tableau ci-dessous :

| MILIEU NEURONAL DE BASE | SUPPLÉMENTS |
|---|---|
| DMEM/F12 : Neurobasal (50:50) | RA 0.1 μ M (stock: 10 mM) (1 μ L ds 1mL F12 - 100X) |
| B27 supplément 50X | SAG 0.5 μ M (stock: 0.5 mM, 1000X) |
| N2 supplément 100X | BDNF 10 ng/ μ L (stock 2: 10 μ g/ μ L, 1000X) |
| PS (1000X) | GDNF 10 ng/ μ L (stock 2: 10 μ g/ μ L, 1000X) |
| β -ME 0.05 mM (stock: 50 mM, 1000X) | DAPT 10 μ M (stock: 10 μ M, 1000X) |
| - | Y 10 μ M (stock 10 mM, 1000X) |

- Préparer un Falcon 15 ml avec 5 μ L de MILIEU NEURONAL DE BASE pour chaque ampoule de cellules à décongeler.
- Placer l'ampoule dans un bain marie à 37°C pendant 1 à 2 min, le temps qu'il ne reste plus qu'un

| | |
|---|---------------------------|
| Julien CARRAS Equipe Nerve-Muscle Interactions (Dr. L. Schaeffer) | Version: 01 du 05/04/2023 |
| PROTOCOLE DE DIFFÉRENCIATION IPS EN MOTONEURONES | |

glaçon.

- Transférer le contenu de l'ampoule dans le Falcon 15 ~~ml~~.
- Centrifuger les Falcon 15 ~~ml~~, pendant 5 min à 1200 ~~rpm~~.
- Aspirer le surnageant.
- ~~Resuspendre~~ le culot cellulaire dans 1 ~~ml~~ de milieu J9.
- Compter le nombre de cellules et ensemercer à 30-20 000 cellules/cm²

Bmg : Après la mise en culture des cellules en p98 ou p384, centrifuger les plaques quelques secondes pour que les cellules adhèrent rapidement (meilleure viabilité et homogénéité dans les puits).

MOTONEURONES J11 : CHANGEMENT MILIEU ET CONTRÔLE QUALITE PROGENITEURS (MARQUEUR OLIG2+)

- Préparer le milieu J11 comme ci-dessous :

| MILIEU NEURONAL DE BASE | SUPPLÉMENTS |
|---|--|
| DMEM/F12 : Neurobasal (50:50) | RA 0.1 μ M (stock: 10 mM) (1μL de 1mL F12 - 100X) |
| B27 supplément 50X | SAG 0.5 μ M (stock: 0.5 mM, 1000X) |
| N2 supplément 100X | BDNF 10 ng/ ml (stock 2: 10 μ g/ ml , 1000X) |
| PS (1000X) | GDNF 10 ng/ ml (stock 2: 10 μ g/ ml , 1000X) |
| β -ME 0.05 mM (stock: 50 mM, 1000X) | DAPT 10 nM (stock: 10 μ M, 1000X) |
| | 5Fdu (stock : , 200") |

- Ne pas retirer le milieu, mais ajouter le milieu J11 avec les facteurs (RA, SAG, BDNF, GDNF et DAPT) à 2X.

- Incuber à 37°C, 5% CO₂.

Contrôle qualité du marqueur OLIG2 par IF : fixation (minimum 8h après la mise en culture des cellules)

- Rincer les puits au PBS (*facultatif*).
- Fixer les puits au PFA 8% (en laissant $\frac{1}{2}$ volume de solution PBS dans les puits) pendant 10 min à RT.
- Rincer 3X avec du PBS et conserver les plaques à 4°C.

PROTOCOLE DE DIFFÉRENCIATION IPS EN MOTONEURONES

MOTONEURONES J14 ET PLUS : CHANGEMENT DE MILIEU ET CONTROLE QUALITE MN (MARQUEUR ISL1+)

- Deux fois par semaine retirer 50% du milieu et remplacer par du milieu ~~neurobasal~~ de base avec les facteurs (BDNF et GDNF) à 2X.

Rmq : à partir de J14, le BDNF et GDNF (facteurs neurotrophiques) sont optionnels.

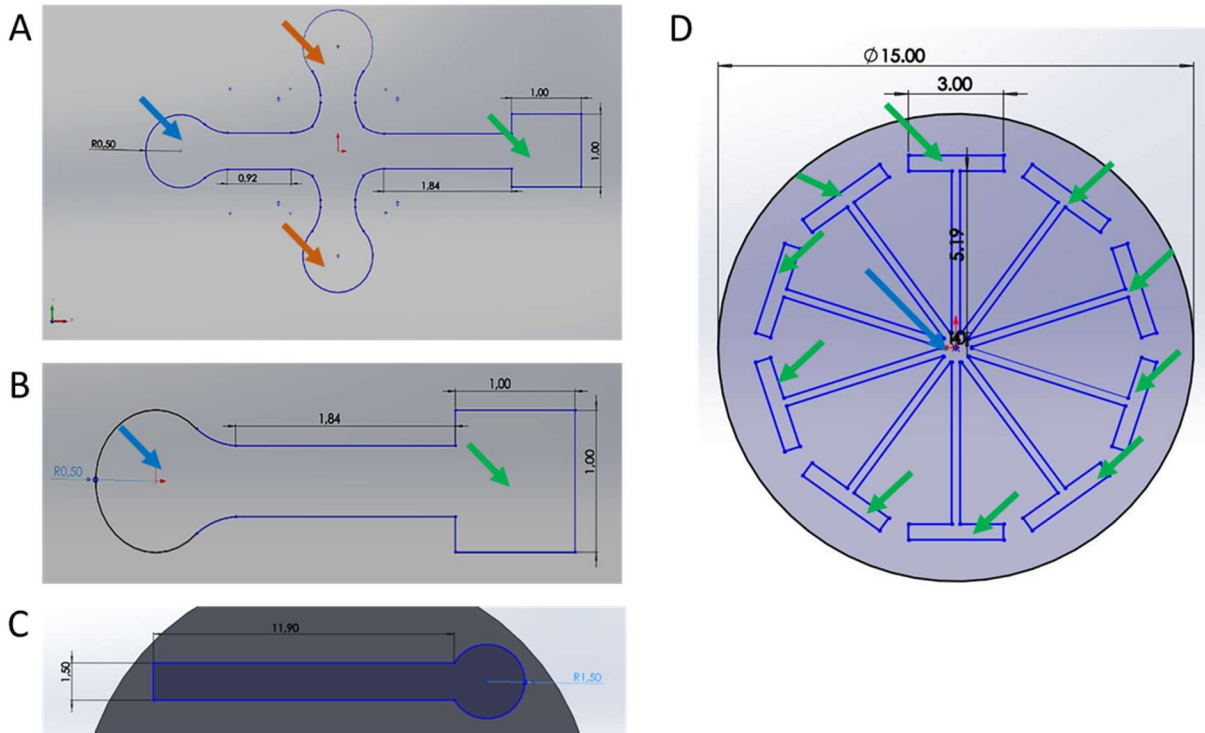
| MILIEU NEURONAL DE BASE | SUPPLÉMENTS |
|------------------------------------|--|
| DMEM/F12 : Neurobasal (50:50) | BDNF 10 ng/mL (stock 2: 10 µg/mL, 1000X) |
| B27 supplement 50X | GDNF 10 ng/mL (stock 2: 10 µg/mL, 1000X) |
| N2 supplement 100X | - |
| PS (1000X) | - |
| β-ME 0.05 mM (stock: 50 mM, 1000X) | - |

Contrôle qualité marqueur ISL1 par IF : fixation

- Rincer les puits au PBS (*facultatif*).
 - Fixer les puits à la PFA 8% (en laissant ½ volume de solution PBS dans les puits) pendant 7 min à RT.
 - Rincer 3X (2X suffisent pour éviter le décollement) avec du PBS et conserver les plaques à 4°C.
- Rmq : ne jamais mettre les puits à sec car risque de décollement.

Annexe 3 : Schémas de 5 moules en silicone pour culture 3D pour l'étude de la croissance axonale et/ou coculture.

A) Modèle pour la tri culture avec un emplacement pour le sphéroïdes de MNs (flèche bleue), un emplacement pour les myoblastes (flèche verte) et deux emplacements pour les cellules de Schwann (flèches orange) B) Modèle pour la co culture motoneurone (flèche bleue) et myotubes (flèche verte) C) Modèle la culture de motoneurone uniquement D) Modèle de puce pour la co culture avec un emplacement pour le sphéroïdes de MNs au centre (flèche bleue) et 10 emplacements pour les myoblastes (flèches vertes) afin de créer plus de jonctions neuromusculaires. Les mesures indiquées sur les schémas sont en mm.





Homozygous COQ7 mutation: a new cause of potentially treatable distal hereditary motor neuropathy

Arnaud Jacquier,^{1,2,†} Julian Theuriot,^{1,3,†} Fanny Fontaine,^{4,†} Valentine Mosbach,^{1,†} Nicolas Lacoste,¹ Shams Ribault,^{1,5} Valérie Risson,¹ Julien Carras,¹ Laurent Coudert,¹ Thomas Simonet,¹ Philippe Latour,^{1,6} Tanya Stojkovic,⁷ Juliette Piard,^{8,9} Anne Cosson,¹⁰ Gaëtan Lesca,¹¹ Françoise Bouhour,^{1,3} Stéphane Allouche,⁴ Hélène Puccio,¹ Antoine Pegat^{1,3} and Laurent Schaeffer^{1,2}

[†]These authors contributed equally to this work.

Distal hereditary motor neuropathy represents a group of motor inherited neuropathies leading to distal weakness. We report a family of two brothers and a sister affected by distal hereditary motor neuropathy in whom a homozygous variant c.3G>T (p.1Met?) was identified in the COQ7 gene. This gene encodes a protein required for coenzyme Q10 biosynthesis, a component of the respiratory chain in mitochondria. Mutations of COQ7 were previously associated with severe multi-organ disorders characterized by early childhood onset and developmental delay.

Using patient blood samples and fibroblasts derived from a skin biopsy, we investigated the pathogenicity of the variant of unknown significance c.3G>T (p.1Met?) in the COQ7 gene and the effect of coenzyme Q10 supplementation in vitro. We showed that this variation leads to a severe decrease in COQ7 protein levels in the patient's fibroblasts, resulting in a decrease in coenzyme Q10 production and in the accumulation of 6-demethoxycoenzyme Q10, the COQ7 substrate. Interestingly, such accumulation was also found in the patient's plasma. Normal coenzyme Q10 and 6-demethoxycoenzyme Q10 levels were restored in vitro by using the coenzyme Q10 precursor 2,4-dihydroxybenzoic acid, thus bypassing the COQ7 requirement. Coenzyme Q10 biosynthesis deficiency is known to impair the mitochondrial respiratory chain. Seahorse experiments showed that the patient's cells mainly rely on glycolysis to maintain sufficient ATP production. Consistently, the replacement of glucose by galactose in the culture medium of these cells reduced their proliferation rate. Interestingly, normal proliferation was restored by coenzyme Q10 supplementation of the culture medium, suggesting a therapeutic avenue for these patients.

Altogether, we have identified the first example of recessive distal hereditary motor neuropathy caused by a homozygous variation in the COQ7 gene, which should thus be included in the gene panels used to diagnose peripheral inherited neuropathies. Furthermore, 6-demethoxycoenzyme Q10 accumulation in the blood can be used to confirm the pathogenic nature of the mutation. Finally, supplementation with coenzyme Q10 or derivatives should be considered to prevent the progression of COQ7-related peripheral inherited neuropathy in diagnosed patients.

- 1 Pathophysiology and Genetics of Neuron and Muscle, CNRS UMR 5261, INSERM U1315, Université Lyon1, Faculté de Médecine Lyon Est, Lyon, France
- 2 Centre de Biotechnologie Cellulaire, CBC Biotec, CHU de Lyon—Hospices Civils de Lyon (HCL) groupement Est, Bron, France
- 3 Hôpital Neurologique Pierre Wertheimer, Service d'électroneuromyographie et de pathologies neuromusculaires, CHU de Lyon—Hospices Civils de Lyon (HCL) groupement Est, Bron, France

Received July 18, 2022. Revised October 30, 2022. Accepted November 20, 2022. Advance access publication December 1, 2022

© The Author(s) 2022. Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com



Severe congenital myasthenic syndromes caused by agrin mutations affecting secretion by motoneurons

Arnaud Jacquier^{1,2} · Valérie Risson¹ · Thomas Simonet^{1,2} · Florine Roussange³ · Nicolas Lacoste¹ · Shams Ribault^{1,4} · Julien Carras^{1,2} · Julian Theuriet^{1,2} · Emmanuelle Girard¹ · Isabelle Grosjean¹ · Laure Le Goff² · Stephan Kröger⁵ · Julia Meltoranta⁵ · Stéphanie Bauché⁶ · Damien Sternberg^{6,7} · Emmanuel Fournier^{6,8,9} · Anna Kostera-Pruszczyk¹⁰ · Emily O'Connor¹¹ · Bruno Eymard^{6,8} · Hanns Lochmüller¹¹ · Cécile Martinat³ · Laurent Schaeffer^{1,2}

Received: 1 February 2022 / Revised: 25 July 2022 / Accepted: 25 July 2022 / Published online: 10 August 2022
© The Author(s) 2022

Abstract

Congenital myasthenic syndromes (CMS) are predominantly characterized by muscle weakness and fatigability and can be caused by a variety of mutations in genes required for neuromuscular junction formation and maintenance. Among them, *AGRN* encodes agrin, an essential synaptic protein secreted by motoneurons. We have identified severe CMS patients with uncharacterized p.R1671Q, p.R1698P and p.L1664P mutations in the LG2 domain of agrin. Overexpression in primary motoneurons cultures in vitro and in chick spinal motoneurons in vivo revealed that the mutations modified agrin trafficking, leading to its accumulation in the soma and/or in the axon. Expression of mutant agrins in cultured cells demonstrated accumulation of agrin in the endoplasmic reticulum associated with induction of unfolded protein response (UPR) and impaired secretion in the culture medium. Interestingly, evaluation of the specific activity of individual agrins on AChR cluster formation indicated that when secreted, mutant agrins retained a normal capacity to trigger the formation of AChR clusters. To confirm agrin accumulation and secretion defect, iPSC cells were derived from a patient and differentiated into motoneurons. Patient iPSC-derived motoneurons accumulated mutant agrin in the soma and increased XBP1 mRNA splicing, suggesting UPR activation. Moreover, co-cultures of patient iPSC-derived motoneurons with myotubes confirmed the deficit in agrin secretion and revealed a reduction in motoneuron survival. Altogether, we report the first mutations in *AGRN* gene that specifically affect agrin secretion by motoneurons. Interestingly, the three patients carrying these mutations were initially suspected of spinal muscular atrophy (SMA). Therefore, in the presence of patients with a clinical presentation of SMA but without mutation in the *SMN1* gene, it can be worth to look for mutations in *AGRN*.

Arnaud Jacquier, Valérie Risson, and Thomas Simonet have contributed equally to this work.

✉ Laurent Schaeffer

laurent.schaeffer@univ-lyon1.fr

¹ Pathophysiology and Genetics of Neuron and Muscle, Faculté de Médecine Lyon Est, CNRS UMR 5261, INSERM U1315, Université Lyon1, Lyon, France

² Hospices Civils de Lyon, Groupement Est, Bron, France

³ INSERM/UEPS UMR 861, Paris Saclay Université, I-STEM, 91100 Corbeil-Essonnes, France

⁴ Service de Médecine Physique et de Réadaptation, Hôpital Henry Gabrielle, Hospices Civils de Lyon, 69230 Saint-Genis-Laval, France

⁵ Department of Physiological Genomics, Biomedical Center, Planegg, Martinsried, Germany

⁶ Inserm U 1127, CNRS UMR 7225, UPMC Université Paris 06 UMR S 1127, Institut du Cerveau et de la Moelle Épinière, ICM, Sorbonne Universités, 75013 Paris, France

⁷ APHP, UF Cardiogénétique et Myogénétique, Service de Biochimie Métabolique, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris, France

⁸ AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 75013 Paris, France

⁹ Département d'Éthique de l'Université et des enseignements de Physiologie de la Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, 75013 Paris, France

¹⁰ Department of Neurology, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland

¹¹ Division of Neurology, Department of Medicine, Children's Hospital of Eastern Ontario Research Institute, The Ottawa Hospital and Brain and Mind Research Institute, University of Ottawa, Ottawa, Canada

Développement d'un modèle cellulaire de motoneurones à partir de cellules iPS pour l'étude des mécanismes physiopathologiques et l'analyse fonctionnelle d'un variant de séquençage impliqué dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth

CARRAS Julien

Date de soutenance : 26/10/2023

RÉSUMÉ

La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) est une neuropathie périphérique génétique rare pour laquelle des mutations dans plus de 80 gènes ont été identifiées comme pathogènes. Cependant plus de 30% des patients restent sans diagnostic moléculaire faute d'identification d'une mutation dans un gène connu et 30% possèdent un variant dans un gène associé à la maladie mais dont la signification pathologique n'est pas certaine².

Afin d'améliorer le diagnostic et la compréhension de la physiopathologie des maladies génétiques du système nerveux périphérique (SNP), il était nécessaire de développer des modèles fonctionnels *in vitro* basés sur les types cellulaires atteints dans ces pathologies. Mon travail a donc débuté par la mise en place d'un protocole de différenciation des cellules iPS humaines en motoneurones (Maury et al 2015⁴⁶). Afin de compléter ce modèle, des cultures 3D en sphéroïdes et des co cultures ont été développées pour se rapprocher autant que possible du contexte *in vivo*. Le modèle de cultures 2D de motoneurones, le plus robuste, a ensuite été utilisé pour l'étude de variants du gène NF-H impliqués dans la CMT2CC. Cette forme de CMT est caractérisée par une neuropathie axonale sévère, à prédominance motrice due à des mutations du gène *Neurofilament Heavy Chain* (NF-H). Cette protéine du cytosquelette joue un rôle dans la croissance axonale mais également dans la régulation du réseau de microtubules ce qui lui confère indirectement un rôle dans le transport axonal.

Mon travail a porté sur la différenciation de deux lignées iPS issues de patients portant deux variants provoquant la perte d'un codon stop. Des résultats de surexpression des protéines mutées en système hétérologue avaient suggéré que les mutations induisaient la formation d'agrégats. Sur cette base, j'ai travaillé à décrire le phénotype des motoneurones issus des cellules iPS dérivées des patients et notamment à confirmer la formation des agrégats. Les marquages de NF-H en immunofluorescence après 24 jours de culture *in vitro* n'ont pas permis de visualiser d'agrégats. Les expériences de western blot ont montré une augmentation de la quantité d' α -tubuline dans les lignées issues des patients, suggérant que les mutations induisent des changements du réseau de microtubules comme précédemment décrit dans des modèles cellulaires déplétés en protéines NF-H^{44,51}.

Enfin, l'analyse transcriptomique des motoneurones a permis d'identifier une liste de gènes dérégulés dans les cellules des patients, ouvrant de nouvelles pistes d'investigations pour la compréhension de la physiopathologie de la CMT2CC.

Au final, en procurant des systèmes *in vitro* proches du contexte physiologique, ce travail montre que les modèles cellulaires basés sur les cellules souches iPS constituent des outils de choix pour l'étude de la physiopathologie des maladies neuromusculaires. Nos travaux ouvrent la voie au développement de systèmes cellulaires pour l'interprétation de variants de signification inconnue qui, avec l'avènement de l'ère post-génomique et le développement des méthodes de séquençage toujours plus puissantes, constitue un des grands défis hospitaliers.

MOTS-CLÉS : Motoneurones, Maladie de Charcot-Marie-Tooth, cellules iPS humaines, Neurofilaments, co cultures



École Pratique
des Hautes Études

