



HAL
open science

Modélisation fonctionnelle de la synapse intégrant cellules souches pluripotentes humaines et optogénétique : application à l'étude des neurotoxines botuliques

Juliette Duchesne de Lamotte

► **To cite this version:**

Juliette Duchesne de Lamotte. Modélisation fonctionnelle de la synapse intégrant cellules souches pluripotentes humaines et optogénétique : application à l'étude des neurotoxines botuliques. Pharmacologie. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASQ018 . tel-04413947

HAL Id: tel-04413947

<https://theses.hal.science/tel-04413947>

Submitted on 24 Jan 2024

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

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

Modélisation fonctionnelle de la synapse intégrant cellules souches pluripotentes humaines et optogénétique : Application à l'étude des neurotoxines botuliques.

Functional modeling of the synapse integrating human pluripotent stem cells and optogenetics: Application to the study of botulinum neurotoxins.

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569, Innovation thérapeutique du fondamental à l'appliqué (ITFA)

Spécialité Doctorat : Sciences Pharmacologiques

Unité de Recherche : Univ Paris-Saclay, Inserm, Univ Evry, Institut des cellules souches pour le traitement et l'étude des maladies monogéniques, 91100, Corbeil-Essonnes, France.

Référent : Université d'Evry val d'Essonne

Thèse présentée et soutenue à Evry, le 2 Avril 2021, par

Juliette DUCHESNE DE LAMOTTE

Composition du Jury

Christian COGNARD DR, CNRS ERL 7003, Université de Poitiers	Président
Afsaneh GAILLARD PU Classe exceptionnelle, INSERM U1084, Université de Poitiers	Rapporteuse & Examinatrice
Laurent SCHAEFFER PU-PH, CNRS UMR5310, Université Claude Bernard Lyon 1	Rapporteur & Examineur
Daniel GILLET DR E7, CEA Saclay	Examineur
Stéphane SEBILLE MCF, ERL CNRS 7368, Université de Poitiers	Examineur
Cécile MARTINAT DR2, INSERM UMR861, Université Evry Val d'Essonne	Co-Directrice de thèse
Anselme PERRIER DR2, CEA/CNRS UMR9199, Université Paris Saclay	Co-Directeur de thèse
Camille NICOLEAU Responsable d'équipe, IPSEN Innovation	Co-Encadrante de thèse



À mes grands-parents Maylis et Albert, à Jérémie, et à toi Neila petit ange qui scintille parmi tous ces astres.

« Il est grand temps de rallumer les étoiles »

- Guillaume Apollinaire -



REMERCIEMENTS

1215 jours, 29160 heures, et 258 pages plus tard... il est grand temps de franchir la ligne d'arrivée et de saluer tous ceux qui ont un jour semé un peu de leur histoire dans la mienne.

Installez-vous bien dans votre canapé, cela risque d'être long !

A mes membres du jury,

Pr Afsaneh Gaillard, Pr Laurent Schaeffer, Dr Stéphane Sebille, Dr Daniel Gillet, et Dr Christian Cognard,

Vous avez accepté, avec un grand intérêt, de juger ce travail. Veuillez trouver dans ce travail, l'expression de mon respect et de ma gratitude, pour avoir aimablement accepté de participer à ce jury de thèse, et pour avoir partagé avec moi un certain nombre de connaissances au cours de mes années d'études. Soyez assurés de l'honneur que vous me faites. Veuillez trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mes sincères remerciements.

A mes directeurs de thèse,

Dr Cécile Martinat et Dr Anselme Perrier,

Vous m'avez fait l'honneur de co-diriger cette thèse pendant 3 ans 3 mois et 29 jours précisément, de m'accompagner jusqu'au bout même si cela n'a pas toujours été un cadeau pour vous (ni pour moi d'ailleurs, alors « merci pour ce moment »), et de la juger toujours avec un regard critique mais juste. Je vous remercie pour votre disponibilité à toute heure, le partage de vos connaissances, votre esprit critique et vos encouragements surtout dans les dernières semaines. Merci également d'avoir été compréhensifs lorsque certains jours se sont obscurcis et d'avoir été des épaules attentives.

Cécile, merci d'avoir partagé avec moi ta passion cachée pour les téléfilms de Noël, merci pour les fous rires partagés avec Jacky et Sandrine pendant notre *escape game* avec l'équipe, merci pour nos discussions scientifiques, merci d'avoir inculqué un esprit d'équipe indétronable à la légendaire équipe « Motoneurones », et merci d'avoir toujours cru au potentiel de l'optogénétique ! Contre toute attente, on l'a fait, et ça c'est une vraie victoire !

Anselme, merci de m'avoir fait prendre conscience que le débat sur « est-ce que je mets plutôt un carré rouge ou alors un encadré vert ou bien est-ce que j'écris en blanc dans le carré jaune ou encore il y a trop de bleu » est un vrai-faux débat de société sur la mise en forme des diapos (Julie et Morgane en sont témoins) ! Merci pour nos moments partagés avec l'ex-équipe HD, les restaurants d'équipes, les *secret Santa*, et les potins depuis votre départ. Ah, je te confirme aussi que « variété » existe dans la langue française... bon surtout en botanique et en mycologie, mais je pense que c'est mon âme de microbiologiste qui a parlé lors de la rédaction de ma thèse.

Je vous adresse mes remerciements les plus sincères à tous les deux. Soyez assurés de ma profonde reconnaissance. Et promis Cécile, je te laisserai mes supers post-it et mes stylos de couleur en quittant le labo !

A ma responsable de thèse,

Dr Camille Nicoleau,

Tu m'as donné ma chance il y a cinq ans en m'acceptant en stage de Master 1, et cela a été le début d'une très grande aventure. Je ne te l'ai jamais avoué, mais le jour où tu m'as appelé pour discuter de ma candidature de stage, j'étais en virée shopping avec des amis et dans une cabine d'essayage. Et puis j'ai laissé échapper ma joie, peut être un peu trop d'ailleurs, alors je pense que les gérants du magasin s'en souviendront toute leur vie. Tu m'as transmis ta passion pour la recherche et surtout

pour les cellules souches, et je crois que cela ne me quittera jamais ! Merci d'avoir contribué à développer mon esprit scientifique, ma curiosité et ma ténacité. Tu m'as appris à ne jamais me décourager quand bien même certains moments étaient difficiles, tu as toujours été présente, tu m'as toujours soutenue et surtout tu as toujours cru en moi. Alors merci simplement pour tout ! Grâce à toi j'ai rencontré des personnes formidables à IPSEN, et surtout une équipe unique qui aura amplement contribué à la réussite de mon projet.

A ma famille de sang et de cœur, haute en couleur mais si précieuse

Si ces derniers mois m'ont appris quelque chose, c'est qu'on se relève toujours, aussi durs que soient les coups, aussi amères que soient les déceptions. Notre famille est comme une boussole, là, contre nos cœurs, qui nous inonde chaque jour de sérénité. Rien ne reste jamais noir trop longtemps. Alors on grandit, on répare, et on sourit, ensemble.

Maman, Papa, Sarah, Pierre et Sacha, merci pour tout, absolument tout, merci pour votre amour inconditionnel.

Laura, Stéphanie et Christian, merci d'avoir ouvert une nouvelle porte de ma vie, merci pour votre affection infinie.

Au reste de la famille, mes grands-parents, mes cousins, mes oncles, mes tantines, ma marraine, merci pour votre tendresse éternelle.

Je vais pouvoir le dire maintenant, encore un « docteur » chez les duduch !

A mes plus fidèles amies, loin des yeux mais toujours près du cœur

Sarah, Justine, Anaïs et Maëlle, mes poitevines de cœur.

Sarah, ma passeuse de cœur, mon pilier de volley, on en aura partagé des choses, tellement de choses, des rires comme des pleurs, des joies comme des désillusions, des voyages, des bêtises (beaucoup de bêtises), des potins, des restos au K avec nos chouchous inavoués de l'équipe pro de volley, des discussions téléphoniques censées durer quelques minutes qui se transforment en des heures, et j'en passe.

Justine, Anaïs, Maëlle, qui aurait pensé que les petites nouvelles de la fac de Poitiers allaient devenir les plus grandes copines. Et on ne s'est jamais lâchées peu importe les aventures et mésaventures, peu importe nos soirées à la BU, peu importe les TP de physiologie animale où malheureusement nous avons fait exploser la carotide du petit lapin (Feu « Bob », de son p'tit nom) que nous étions en train d'opérer et qui nous a valu de repeindre la blouse des copains en rouge, peu importe le tournoi de la nuit du volley passé avec vous, et les fondants chocolat-caramel... que de grands moments passés avec vous.

Alors pour tout ça et pour tout ce qui nous reste à vivre ensemble, merci les filles, merci pour votre amitié indéfectible.

A ma famille sportive qui m'a adoptée pour le meilleur et surtout pour le pire

Titi et Elé, mes deux mamans de volley, merci pour vos encouragements et vos conseils, pour toutes nos discussions sur la vie, pour nos repas, merci de m'avoir requinquée dans les moments de doutes, merci d'avoir partagé avec moi certaines larmes, pour votre amitié sincère qui m'a permis d'avancer pas à pas ces dernières années.

Alex, mon frère de potins, mon binôme de volley, merci pour ton soutien sans faille peu importe les épreuves, nos confidences, ta tendresse, ton sourire et ton humour qui m'ont permis de garder le cap à chaque instant. Il aura fallu quelques secondes il y a trois ans pour transformer un simple bonjour en une grande histoire d'amitié. [Nuggets se joint également à moi pour te remercier de t'être occupé d'elle avec Vava].

Mon rayon de soleil du volley, Tanguy, le seul à recevoir un « oscar » collector pour son cactus tatoué [...], merci pour nos rires partagés, nos apéros avec Alex, ta folie et ta vision tellement particulière de la vie, qui aurait pu croire un jour qu'une rumeur puisse aboutir à une amitié si innocente et tellement convoitée. N'oublie pas notre pari sur le futur de nos vies...

Mes coéquipières de la team SF1 des P'tits chats, et puis les autres volleyeurs qui ont croisés ma route et qui ne l'ont toujours pas quittée, sans qui les discussions farfelues, bière ou verre de vin dans une main et bretzels dans l'autre jusqu'à 3h du mat' resteront dans les annales, merci pour votre bienveillance, nos fous rires sur le terrain et en dehors, nos entraînements loufoques et insupportables parce qu'une équipe de filles c'est vraiment insupportable (petite pensée pour coach), et tous nos instants de partage pour les restos d'équipe, pour manger du couscous, des macarons, un gâteau au chocolat sans farine ni œufs (le fameux), et nos rdv débrief dans notre QG officiel le Burger King.

Et enfin le Bureau, de magnifiques rencontres, Sylvie, Jool, Bibi, Xavier, Did, Seb, Amaury, Quentin, Karina avec qui je partage depuis deux ans maintenant le volley, les déboires de la ligue, et surtout le covid ! Il paraît que gérer un club de sport est difficile, mais avec vous tout est devenu tellement facile. Vous avez toujours été un soutien sans faille, vous avez été là pour m'apaiser dans les moments où mon franc-parler a pris le dessus, et puis sans vous les dimanches midis ou lundis soirs auraient été bien différents. Nous avons accompli tellement de choses ensemble jusque-là, j'espère sincèrement que notre aventure va perdurer encore quelques années.

A tous mes collègues d'IPSEN, devenus aujourd'hui de vrais amis

Jacque et Nathalie, merci pour tout, vraiment tout. Vous avez été là pour moi dès le premier jour et vous ne m'avez jamais plus lâché. Merci pour votre bienveillance à tout instant, votre capacité d'écoute, vos encouragements, tous les repas et apéro partagés, les bons vins que vous m'avez fait goûter, les expositions où j'en ai pris plein la vue, toutes nos discussions qui m'ont permis d'avancer pas à pas, notre passion commune (ou bien cachée) pour les chats.

Stéphane, merci pour ta passion de la vie, pour nos discussions sur tout et surtout n'importe quoi, notre adoration commune pour les autopsies (bon dit comme ça, cela peut paraître un peu glauque) et les immunohisto enfin surtout la fluo (sans quoi je n'aurai jamais pu faire une aussi belle photo du cerveau pour illustrer mon manuscrit), pour avoir eu le courage de supporter mes idées un peu farfelues, mes blagues et mes débordements bienveillants à l'égard de tes stagiaires ou pour décorer ton bureau et voler tes livres de chevet avec tes stagiaires.

La team *in vitro*... Mon Lolo, avec qui la première rencontre fut épique, moi en béquilles et toi obligé de m'ouvrir toutes les portes de l'Institut Pasteur. A ce moment-là tu n'avais aucune idée dans quoi tu allais t'embarquer pour trois longues années avec moi ta future collègue d'exception. Mais tu as survécu et tu m'as supporté coûte que coûte, à chaque instant même les moments de doutes, même si je sais qu'au fond de toi tu as toujours été halluciné par mon caractère et mes blessures au volley. Et nos petits séjours pour les congrès et les formations (je ne parlerai pas de la formation Lentivirus, les mini-sandwichs me restent toujours en travers), impossible de les oublier ! Les bonnes bières de Cardiff, le magnifique chalet avec des décorations de Noël inoubliables, et puis ma petite peluche de dragon que je garderai à vie et dont mon chat est devenu jaloux. Un jour une adorable personne (qui t'a jeté un Kinder à la figure) t'a offert un diplôme du meilleur collègue du monde, elle n'avait pas tort finalement, tu es le collègue qu'on aimerait tous avoir, celui qui se moque de tout, qui rigole de tout et de tout le monde, mais qui reste bienveillant et avec qui parler science tout en partageant un café et un muffin au caramel est tellement essentiel.

Mon Sysy, nos chamailleries, ta collection de post-it qui décore ton bureau (dont la majorité ont été écrits par moi je l'avoue), tes blagues -18, et ta passion pour mes plantes vont me manquer. Merci d'avoir partagé le bureau avec moi, notre petit carré avec Lolo va terriblement me manquer. Je

compte te léguer ma collection de petits bonnets à vie pour que tu gardes un souvenir précieux de nos années épiques partagées. Par contre je demande la garde exclusive de notre Pikachu 3D !

Elsa, mon point de ralliement à la réalité du système et des potins en tout genre, mon binôme de hotte de culture, de projet abracadabrant de jonction neuromusculaire. Je n'oublierai jamais ce voyage invraisemblable à Marseille que nous avons partagé où nous avons failli ne jamais arriver à destination à cause du conducteur de taxi se prenant pour un acteur de *Fast and Furious*, ni même rentrer chez nous à cause de l'énorme tempête qui nous a donné quelques frayeurs dans l'avion.

La team *ex vivo*... Sissi, la bonne humeur incarnée et le petit brin de folie en plus qu'il fallait, et Kevin avec qui la complicité fut immédiate et la communication tellement explosive, tels les Huguette et Raymond de « Scènes de ménage ».

Et celles qui ont fait partie de l'équipe pendant ces dernières années, Solène et Céline, avec qui j'ai pu échanger de très grands moments de sciences mais pas que !

A vous mes compères et complices de la team *in vitro/ex vivo*... Merci à tous d'avoir tant partagé, de m'avoir supporté, même si je sais que je vous ai mené la vie dure, et qu'aujourd'hui vous comptez les jours restant avant de enfin vous débarrasser de moi.

Et puis Johannes, merci de m'avoir ouvert la porte de cette grande équipe, merci pour ton management et ton engagement, ton accueil et surtout ta très grande bienveillance à l'égard de tous. Je sais aujourd'hui ce que c'est d'être un grand chef !

Et enfin tous les autres du labo, que je ne pourrai citer tellement la liste est longue, Sylvie, Luce, Denis, Vincent, Alban et tous les autres... et parce que j'aurai encore tellement à dire, merci à tous !

Aux istémiens, à vous mes « évadées de la team HD », à l'équipe « Motoneurones »

Julie, Morgane, Patricia et Axelle, merci de m'avoir accueillie dans votre équipe et de m'avoir permis de me sentir un peu comme à la maison, merci pour tous nos moments partagés qu'ils soient scientifiques ou humains, nos after-works, notre *secret Santa* du tonnerre, toutes nos discussions de filles et les potins qui vont avec, toutes nos révolutions sur le système, nos échanges de post-it, nos talents de décoratrices du bureau d'Anselme avec des tubes eppendorf en guise de guirlande de Noël, et j'en passe. Et surtout merci pour votre soutien inépuisable depuis que vous êtes parties pour de nouveaux horizons.

Julie, Camille, Sandrine, Florine, Jacky, Adeline et Antoine, merci pour ces années passées avec vous tous, pour les bons moments (jusqu'à ce que le mode *survivor* soit enclenché), les petits déj' du vendredi matin, les longues discussions en secteur 7 pour se raconter les dernières news toutes fraîches, nos passions communes pour les journées dans le noir parce que la microscopie c'est la vie, pour le debrief des téléfilms de l'après-midi passés sur TF1/M6 ou Netflix, merci pour tout ça.

A tous les autres istémiens, mes coéquipiers (les meilleurs) du secteur 7 Axel et Sandra, aux experts de l'imagerie sans qui rien n'aurait été possible Jérôme et Céline, à celles qui ont sauvé la fin de ma thèse avec les productions de cellules Léa et Pauline, et puis à tous les autres avec qui j'ai eu la chance de partager des moments exquis, un grand merci !

Enfin, au Dr Francis Chaouloff,

Sans qui ma passion pour les neurosciences n'aurait jamais existé. Merci infiniment pour ça !

Merci à tous de m'avoir montré que la recherche était avant tout une vraie aventure humaine.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES FIGURES	1
TABLE DES TABLEAUX	3
ABRÉVIATIONS	5
AVANT-PROPOS	7
INTRODUCTION	10
Chapitre 1 : Neurotoxines botuliques, une promesse thérapeutique.....	11
I. Histoire des neurotoxines botuliques : du poison à la thérapeutique.....	12
A. Premiers manifestes médicaux sur le botulisme au XIX ^{ème} siècle.....	12
B. Identification de l'agent pathogène, le <i>Clostridium botulinum</i>	13
C. Recherches sur les neurotoxines botuliques au XX ^{ème} siècle.....	13
II. Structure et sérotypes des neurotoxines botuliques.....	15
A. Structure des neurotoxines botuliques.....	15
B. Différents sérotypes de neurotoxines botuliques.....	17
III. Mécanisme d'action des neurotoxines botuliques.....	19
A. Liaison de la toxine à la membrane présynaptique neuronale.....	20
B. Internalisation et translocation de la toxine dans les terminaisons neuronales.....	21
C. Inhibition de la libération des neurotransmetteurs.....	22
D. Réversibilité d'action de la neurotoxine botulique.....	23
IV. Neurotoxines botuliques et thérapeutique.....	24
V. Modèles d'études des neurotoxines botuliques.....	26
A. Modèles d'études <i>in vivo</i> de rongeurs.....	27
1. « Mouse BioAssay ».....	27
2. "Digit Abduction Score" ou DAS.....	28
3. "Dynamic Weight Bearing" ou DWB.....	29
B. Modèles d'études <i>ex vivo</i> de rongeurs.....	30
C. Modèles d'études cellulaires.....	31
1. Cellules immortalisées.....	32
2. Cellules primaires neurales.....	32
3. Cellules souches neurales dérivées de cellules souches pluripotentes humaines.....	32
Chapitre 2 : Cellules souches et pluripotence.....	35
I. Cellules souches : sésame de la recherche.....	36
A. Cellules souches : définitions.....	36

B.	Différents types de cellules souches.....	37
1.	Cellules souches embryonnaires.....	37
2.	Cellules souches pluripotentes induites.....	39
II.	Cellules souches pluripotentes.....	40
A.	Induction de la pluripotence	40
1.	Transfert nucléaire somatique	41
2.	Fusion des cellules somatiques et des cellules souches embryonnaires.....	42
3.	Reprogrammation induite.....	43
B.	Cellules souches pluripotentes induites.....	43
1.	Choix des cellules à reprogrammer	44
2.	Choix des facteurs de reprogrammation	44
3.	Méthodes de vectorisation	46
4.	Caractéristiques moléculaires et contrôle qualité.....	48
C.	Différenciation des cellules souches pluripotentes induites en progéniteurs neuronaux.....	48
III.	Cellules souches pluripotentes induites : outil précieux pour la médecine.....	53
A.	Modélisation pathologique	54
B.	Développement de médicaments.....	56
C.	Thérapie cellulaire	58
	Chapitre 3 : Synapse neuromusculaire	60
I.	Jonction neuromusculaire	61
A.	Développement morphologique et moléculaire de la jonction neuromusculaire	61
B.	Mécanisme de la transmission neuromusculaire.....	64
II.	Développement des composantes présynaptiques et post-synaptiques.....	65
A.	Développement de la moelle épinière	65
B.	Méthodes de différenciation des neurones moteurs à partir des cellules souches pluripotentes induites.....	66
C.	Méthodes de différenciation des fibres musculaires squelettiques	68
D.	Mise en place d'un réseau neuromusculaire actif <i>in vitro</i>	70
III.	Etude de la fonctionnalité synaptique.....	74
A.	Mesure de l'activité électrique et électrochimique par « Microelectrode Array ».....	74
B.	Mesure de la dynamique calcique	76
1.	Utilisation d'indicateur calcique synthétique.....	76
2.	Utilisation d'indicateur calcique génétiquement codé	77
C.	Contrôle de l'activité synaptique via les outils optogénétiques	79
	Chapitre 4 : Synapse neuro-neuronale.....	83

I. Développement du cortex cérébral.....	83
II. Mécanisme de la transmission glutamatergique.....	86
III. Mise en place d'un réseau cortical actif	88
A. Méthodes de différenciation corticale des cellules souches neurales	88
B. Synapse corticale, outil d'étude des circuits cérébraux dans les troubles neurologiques	91
OBJECTIFS ET DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE	93
TRAVAUX DE RECHERCHE	97
Revue bibliographique	98
Article de recherche	140
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	180
I. Des cellules souches pluripotentes induites humaines aux populations neuronales : clés de l'étude des neurotoxines botuliques	181
A. Potentiel des neurones dérivés de cellules souches pluripotentes induites humaines.....	181
B. Stratégie de coculture	183
II. De la modélisation des systèmes synaptiques à l'étude de la fonctionnalité	185
A. Choix de la synapse pour l'étude des neurotoxines botuliques	186
B. Etude des neurotoxines botuliques sur la synapse glutamatergique cortico-corticale.....	188
C. Stratégies de mesure de la fonctionnalité : vers du haut débit	192
III. L'ingénierie des neurotoxines botuliques : vers une amélioration du potentiel thérapeutique.....	195
CONCLUSION	197
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	200

TABLE DES FIGURES

Figure 1	A l'origine de l'histoire mouvementée de la neurotoxine botulique
Figure 2	Microscopie de la section histologique de la viande contaminée
Figure 3	Structure de la BoNT de type A
Figure 4	Mécanisme d'action de la BoNT au niveau de la jonction neuromusculaire
Figure 5	Liaison de la BoNT à la membrane présynaptique neuronale
Figure 6	Clivage des protéines SNARE dépendant du sérotype de BoNT
Figure 7	Phénomène de « sprouting » à la JNM après injection de BoNT
Figure 8	Réponse au DAS de la souris et du rat après injection de BoNT/A
Figure 9	Dispositif expérimental <i>ex vivo</i>
Figure 10	Différents niveaux de différenciation des cellules souches
Figure 11	Génération des cellules souches pluripotentes induites humaines
Figure 12	Méthodes de reprogrammation des cellules somatiques
Figure 13	Circuit de régulation transcriptionnelle des facteurs de reprogrammation
Figure 14	Stratégies de vectorisation pour la reprogrammation des cellules somatiques
Figure 15	Régionalisation du cerveau embryonnaire
Figure 16	Différenciation des cellules souches pluripotentes
Figure 17	Principes de l'induction neurale
Figure 18	<i>Dual-SMAD inhibition</i>
Figure 19	Applications des cellules souches pluripotentes induites
Figure 20	Différentes approches de modélisation pathologique
Figure 21	Organisation de la jonction neuromusculaire
Figure 22	Voie de signalisation Agrine-MuSK
Figure 23	Modèles d'innervation des muscles chez certains vertébrés
Figure 24	Transmission synaptique à la jonction neuromusculaire
Figure 25	Neurogenèse de la moelle épinière
Figure 26	Formation du muscle squelettique
Figure 27	Modèles <i>in vitro</i> de jonction neuromusculaire
Figure 28	Réseau de neurones interconnectés sur des microélectrodes

- Figure 29** Structure et fonctionnement des indicateurs calciques génétiquement codés
- Figure 30** Stratégies optogénétiques
- Figure 31** Nouveaux variants du ChR2 sensibles à la lumière rouge
- Figure 32** Organisation des couches corticales dans le cortex cérébral humains
- Figure 33** Neurogenèse corticale
- Figure 34** Transmission synaptique glutamatergique
- Figure 35** Spécification des sous-types de projections des neurones corticaux
- Figure 36** Modélisation de la corticogenèse *in vitro* 2D et 3D
- Figure 37** Protocoles de différenciation des neurones moteurs et corticaux établis au laboratoire I-Stem
- Figure 38** Résumé graphique des travaux de recherche
- Figure 39** Cocultures 2D vs 3D
- Figure 40** Caractérisation fonctionnelle des synapses corticales
- Figure 41** Sensibilité des synapses corticales aux BoNT
- Figure 42** Effet des BoNT sur la dynamique calcique des synapses corticales

TABLE DES TABLEAUX

Tableau I	Caractéristiques des différents sérotypes de BoNT
Tableau II	BoNT disponibles dans le commerce
Tableau III	Nouvelles indications pour lesquelles les BoNT sont à l'étude
Tableau IV	Facteurs de reprogrammation des cellules humaines
Tableau V	Méthodes de vectorisation pour la reprogrammation
Tableau VI	Exemples de protocoles d'induction de neurones moteurs à partir de CSPi
Tableau VII	Exemples de modèles humanisés <i>in vitro</i> de jonction neuromusculaire
Tableau VIII	Exemples d'indicateurs calciques synthétiques
Tableau IX	Exemples de protocoles d'induction de neurones corticaux à partir de CSPi

ABRÉVIATIONS

AA : Acide ascorbique

ACh : Acétylcholine

AChE : Acétylcholinestérase

AChR : Récepteur à l'acétylcholine

ALS : Amyotrophie spinale latérale

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique acid

AMPC : Adénosine monophosphate cyclique

BDNF : *Brain Derived Neurotrophic Factor*

BMP : *Bone Morphogenic Proteins*

BMPR1A : *Bone Morphogenic Protein Receptor 1A*

BoNT : Neurotoxine botulique

Ca²⁺ : Calcium

CAG : *CMV early enhancer/chicken β -actin*

CaM : Calmoduline

CaMKII : *Calcium/Calmodulin-dependent Kinase II*

CGRP : *Calcitonin Gene-Related Peptide*

ChR2 : Canal-rhodopsine 2

CMV : *human Cytomegalovirus*

c-MYC : *Myc proto-oncogene protein*

CNQX : Cyanquixaline

CNTF : *Ciliary Neurotrophic Factor*

CP : Plaque corticale

CSE : Cellules souches embryonnaires

CSP : Cellules souches pluripotentes

CSPi : Cellules souches pluripotentes induites

DAPV : D-2-amino-5-phosphonolaverate

DAS : *Digit Abduction Score*

DKK1 : *Dickkopf-related protein 1*

DL₅₀ : Dose létale 50

Dok-7 : *Downstream of kinase 7*

DPI : Diagnostic pré-implantatoire

DWB : *Dynamic Weight Bearing*

EAAT : *Excitatory Amino Acid Transporter*

EB : Corps embryonnaires

EFNB1 : *Ephrin B1*

EGF : *Epidermal Growth Factor*

EGFP : Protéine GFP améliorée

EMA : *European Medicines Agency*

Fbx15 : *F-box protein 15*

FDA : *Food and Drug Administration*

FIV : Fécondation in vitro

FGF : *Fibroblast Growth Factor*

G : Muscle gastrocnémien

GABA : Acide γ -aminobutyrique

GCaMP : *Green fluorescent protein (GFP)-Calmodulin fusion Protein*

GD1a/ GD1b/GM1/GT1b : Gangliosides

GDF11 : *Growth Differentiation Factor 11*

GDNF : *Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*

GECI : *Genetically Encoded Calcium Indicators*

Gln : Glutamine

Glu : Glutamate

GSK-3 β : *Glycogen Synthase Kinase 3 β*

HC : *Heavy Chain*, chaîne lourde

HGF : *Hepatocyte Growth Factor*

hSyn1 : *human Synapsin 1*

IGF1/2 : *Insulin-like Growth Factor 1/2*

IP : Progéniteurs intermédiaires

IZ : Zone intermédiaire

JNM : Jonction neuromusculaire

KLF4 : *Kruppel-Like Factor 4*

Lbx1 : *Ladybird homeobox 1*

LC : *Light Chain*, chaîne légère

LIF : *Leukemia Inhibitory Factor*

Lrp4 : *Low-density lipoprotein receptor-related protein 4*

MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MBA : *Mousse BioAssay*

MCI : Masse cellulaire interne

mCSE : Cellules souches embryonnaires murines

MEA : *Microelectrode Array*

mGluR : *Metabotropic Glutamate Receptor*

MuSK : *Muscle Specific Kinase*

Myf5 : *Myogenic factor 5*

MyoD : *Myoblast determination protein 1*

MZ : Zone marginale

NBA : *Neuronal Cell-Based Assay*

NEAA : *Non-Essential Amino Acid*

NMDA : *N-methyl-D-aspartate*

NpHR : Halorhodopsine

NR : Non renseigné

NTNHA : *NonToxic NonHemagglutinin*

OCT3/4 : *Octamer-binding Transcription factor 3/4*

oRGC : Cellules gliales radiales externes

Pax3/6/7 : *Paired box gene 3/6/7*

PNHD : *Phrenic Nerve HemiDiaphragm*

POU5F1 : *POU class 5 Homeobox 1*

PSG : Polysialoganglioside

PTN : *Pleiotrophin*

RA : Acide rétinoïque

ReaChR : *Red-activatable Channelrhodopsin*

ROCK : *Rho-associated coiled-coil containing protein kinase*

SALL4 : *Spalt like transcription factor 4*

SDF-1 : *Stromal cell-derived Factor 1*

sFRP1 : *secreted Frizzled-Related Protein 1*

Shh : *Sonic hedgehog*

SMN1/2 : *telomeric survival motor neuron*

SNAP23/25 : *Synaptosomal-Associated Protein 23/25 KDa*

SNARE : *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor*

SOX1/2 : *SRY-box transcription factor 1/2*

SP : Sous-plaque

SSEA3/4 : *Stage Specific Embryonic Antigen 3/4*

SV2 : *Synaptic Vesicle protein 2*

SVZ : Zone sous-ventriculaire

Syt : Synaptotagmine

TALEN : *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*

TGF- β : *Transforming Growth Factor- β*

TRA-1-60/81 : *Tumour Rejection Antigen*

TRP : *Transient Receptor Potential*

Trx : Thiorédoxine

TrxR : Thiorédoxine réductase

t-SNARE : SNARE cible

TTX : Tétrodotoxine

UTF1 : *Undifferentiated Embryonic Cell Transcription Factor 1*

VAMP : *Vesicle-Associated Membrane Protein*

VEGFD : *Vascular Endothelial Growth Factor D*

vGluT : *Vesicular Glutamate Transporter*

VPA : Acide valproïque

vRGC : Cellules gliales radiales ventriculaires

v-SNARE : SNARE vésiculaire

VZ : Zone ventriculaire

ZFN : *Zinc-Finger Nucleases*

AVANT-PROPOS

Le marché du médicament est l'un des plus importants à travers le monde. Les processus de recherche et développement conduisant à la mise sur le marché sont toutefois lents et coûteux, et se heurtent à un certain nombre d'obstacles. L'un des obstacles majeurs provient du fait que les modèles utilisés dans les phases de découverte et d'évaluation des nouveaux composés sont souvent peu représentatifs de la physiologie des patients. Depuis plusieurs années, l'industrie pharmaceutique cherche à développer de nouveaux modèles plus pertinents afin d'augmenter la valeur translationnelle de la recherche préclinique. Dans ce contexte, les cellules souches pluripotentes humaines sont apparues comme une ressource biologique clé pour le développement de modèles cellulaires de nouvelles générations. La propriété de prolifération illimitée des cellules souches pluripotentes permet de s'affranchir de la limitation en ressource biologique comme cela a été précédemment le cas pour les cellules cancéreuses ; quant à la propriété de pluripotence elle permet d'obtenir tous les types cellulaires de l'organisme, parfois inaccessibles par d'autres moyens, à condition de pouvoir disposer de protocoles de différenciation robustes et adaptés au phénotype cellulaire recherché. Parmi les cellules souches pluripotentes se distinguent les cellules souches pluripotentes induites humaines qui offrent des axes de recherche prometteurs pour de nombreuses applications thérapeutiques.

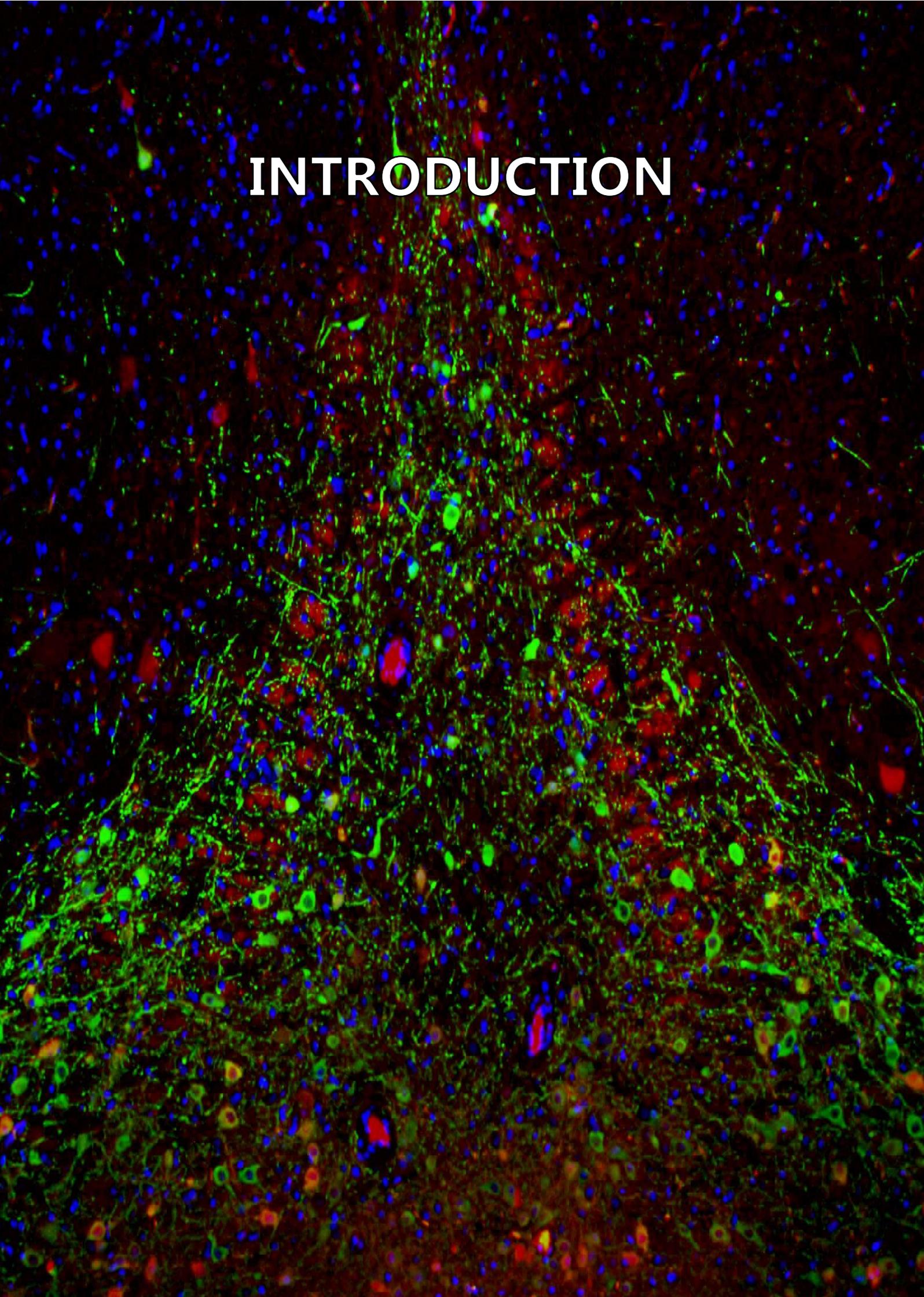
Le développement de nouvelles thérapeutiques est aujourd'hui de plus en plus dédié à la neurologie, faisant de ce domaine l'un des trois axes thérapeutiques majoritairement explorés (après l'oncologie et l'infectiologie). Les neurosciences gagnent petit à petit du terrain avec comme objectif principal d'aider les patients atteints de pathologies dans ce domaine à améliorer leur qualité de vie en soulageant les symptômes invalidants et douloureux, et à proposer un potentiel traitement curatif sûr et efficace. Depuis les années 1990, le laboratoire IPSEN concentre ses efforts sur la recherche de pointe dans les neurotoxines et l'ingénierie des neurotoxines recombinantes. Comme Dr Jekyll et M. Hyde, les neurotoxines botuliques ont une double "personnalité", ce qui les rend uniques parmi les toxines d'origine bactérienne. Comme Dr Jekyll, ces neurotoxines sont des médicaments biologiques (exemple du Dysport®) approuvés pour traiter les troubles musculosquelettiques ou des muscles lisses suite à une pathologie neurologique alors que, comme M. Hyde, elles sont aujourd'hui les neurotoxines les plus puissantes et dangereuses. Les neurotoxines botuliques ont un potentiel

d'applications thérapeutiques très large qui dépasse le domaine de la neurologie : l'urologie, l'oncologie, l'endocrinologie et la douleur. IPSEN collabore avec des centres de recherche académique pour faire progresser son pipeline de neurotoxines, les connaissances sur les différents sérotypes, ainsi que sur leurs mécanismes d'action qui cachent encore bien des mystères. Cependant, toute nouvelle molécule à potentiel thérapeutique nécessite d'être étudiée sur un modèle pertinent, dans un contexte humain représentatif du patient, et surtout compatible avec des tests à haut débit. L'utilisation des cellules souches pluripotentes induites humaines représente ainsi une approche novatrice pour l'étude des neurotoxines botuliques, et constitue même une alternative aux modèles d'étude de ces neurotoxines déjà existants et limités par des difficultés techniques, biologiques et éthiques. Dans ce contexte, IPSEN a choisi de collaborer avec le laboratoire I-Stem (Institut des cellules souches pour le traitement de l'étude des maladies monogéniques/Inserm Université Paris-Saclay). Fort de son expérience depuis sa création en 2005, I-Stem explore le potentiel thérapeutique des cellules souches pluripotentes humaines dans le cadre de maladies monogéniques.

Ce projet de thèse a abouti à un véritable travail de collaboration entre l'industrie pharmaceutique et la recherche académique. Ce « mariage de raison » a permis de mettre au point de nouveaux modèles cellulaires humains sensibles aux neurotoxines botuliques. Ce programme a bénéficié de l'expérience de l'équipe dirigée par le Dr Cécile Martinat utilisant des lignées de cellules souches pluripotentes pour mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement de certaines maladies neuromusculaires, et de celle dirigée par le Dr Anselme Perrier qui s'intéresse aux interactions cellules-cellules dans les maladies neurodégénératives telles que la maladie de Huntington dans des modèles dérivés de cellules souches pluripotentes. Ainsi, ma contribution à ce projet a été d'utiliser l'expertise et les protocoles de culture cellulaire établis dans ces deux équipes afin de développer deux modèles cellulaires de synapses fonctionnelles et d'évaluer leur sensibilité aux neurotoxines botuliques développées par IPSEN. En adéquation avec les thématiques de recherche des équipes d'I-Stem et la pertinence pour l'étude des neurotoxines botuliques, deux systèmes synaptiques, neuromusculaire et cortico-cortical, ont été développés et caractérisés sur le plan phénotypique et fonctionnel. La deuxième partie du travail de thèse a été d'évaluer la sensibilité de ces deux systèmes synaptiques aux neurotoxines botuliques en s'intéressant plus particulièrement aux effets sur la transmission synaptique, ces neurotoxines ayant la propriété d'inhiber la neurotransmission préférentiellement au niveau de la jonction neuromusculaire mais également au niveau d'autres synapses. La dernière partie du travail a amené à implémenter nos systèmes avec des

outils d'imagerie calcique et d'optogénétique compatibles avec le moyen à haut débit, visant à élargir les connaissances sur les mécanismes des neurotoxines botuliques au niveau synaptique afin d'affiner les approches thérapeutiques existantes et d'élaborer de nouvelles indications de traitement.

INTRODUCTION



Chapitre 1 : Neurotoxines botuliques, une promesse thérapeutique

Les neurotoxines botuliques ont marqué une révolution dans la prise en charge des patients atteints de diverses pathologies. Molécules devenues un incontournable de la médecine esthétique aujourd'hui grâce aux frères Carruthers, leurs premières utilisations en thérapeutique remontent à la moitié du XX^{ème} siècle. C'est en 1980 que le Dr Alan Scott teste pour la première fois et avec succès l'un des sérotypes de neurotoxines botuliques, le sérotype nommé A, dans le but de traiter le strabisme chez l'Homme. Près de dix ans plus tard, la *Food and Drug Administration* (FDA) américaine approuve le premier médicament à base de toxine. Au cours de ces dernières années, bien que les toxines aient été largement utilisées pour diverses procédures cosmétiques, la cosmétologie médicale n'est qu'un petit créneau de ce que les toxines sont capables de faire. L'utilisation des toxines s'est étendue à de nombreuses pathologies caractérisées par une hyperactivité musculaire ou un dérèglement du système nerveux autonome, avec une remarquable efficacité.

Ainsi, la sécurité d'usage, associée à une grande polyvalence, est la raison majeure du succès des neurotoxines botuliques pour lesquelles de nouvelles indications sont envisagées chaque année afin de répondre à un besoin accru en nouvelles thérapies.

Afin de comprendre les progrès et les aboutissements amenant à cette révolution thérapeutique, il est important d'en comprendre l'histoire et notamment ceux qui en ont fait une promesse thérapeutique, les propriétés, les usages et les défis (Figure 1).



Figure 1. A l'origine de l'histoire mouvementée de la neurotoxine botulique (Erbguth, 2008)

De gauche à droite : Justinus Kerner (1786–1862), Emile Pierre van Ermengem (1851–1922), Edward J. Schantz (1908–2005), Alan B. Scott.

I. Histoire des neurotoxines botuliques : du poison à la thérapeutique

A. Premiers manifestes médicaux sur le botulisme au XIX^{ème} siècle

En 1815, J.G. Steinbuch, officier de santé dans le village de Herrenberg en Allemagne, rapporta aux autorités de santé le cas de sept patients intoxiqués après avoir consommé des saucisses fumées. Trois de ces patients décéderont. Non loin de là, Justinus Kerner, jeune médecin, fit lui aussi état d'une intoxication alimentaire mortelle. Le nombre de cas suspects d'intoxication augmenta les années qui suivirent à cause de la mauvaise conservation et du mauvais stockage des viandes en cette période de grande pauvreté.

En 1820, Kerner publia une étude réalisée sur soixante-seize patients souffrant d'empoisonnement mortel après ingestion de saucisses fumées. Dans son étude Kerner donna une description clinique complète de ce qui est aujourd'hui reconnu comme le botulisme. Il émit également l'hypothèse que ce « poison des saucisses » était d'origine biologique, en se basant sur les similitudes avec d'autres poisons connus comme le venin de serpent, la nicotine et l'atropine. Il entreprit ensuite des expériences sur les animaux, avec pour ambition d'extraire et d'isoler la substance toxique encore inconnue. Pour se faire il administra la toxine extraite directement des viandes contaminées à différents types d'animaux (oiseaux, chats, lapins, grenouilles, criquets, etc.) et observa l'apparition de plusieurs symptômes qu'il détailla par la suite. En 1822, Kerner publia une nouvelle étude comprenant les résultats de ses expériences sur les animaux, ainsi qu'une centaine de rapports d'autopsies de patients intoxiqués. Il y décrit précisément tous les symptômes observés allant de la paralysie musculaire (muscles respiratoires, muscles des membres supérieurs et inférieurs) à des troubles végétatifs tels que la mydriase (dilatation des pupilles), la diplopie (vision double), les troubles gastro-intestinaux et vésicaux. Ainsi, de ses nombreuses études et observations, Kerner conclut que, i) la toxine se développe dans les viandes mal conservées dans des conditions anaérobies, ii) la toxine agit en interrompant la transmission du signal nerveux moteur et autonome laissant le signal sensoriel intact, iii) la toxine est très puissante même à petite dose, iv) la toxine pourrait avoir un potentiel thérapeutique pour traiter de nombreux troubles. En effet, Kerner émit l'hypothèse que la toxine à de faibles doses pouvait réduire ou bloquer l'hyperactivité et l'hyperexcitabilité du système nerveux (Erbguth, 1998, 2004, 2008). Ainsi, un poison potentiel pourrait être transformé en un bienfait pour la santé. Kerner devint l'un des précepteurs de la recherche sur les intoxications d'origine alimentaire. D'autres publications de divers auteurs parurent les années

suivantes, signalant de nouveaux cas d'intoxications survenues après consommation de viandes mais aussi de poissons. « La maladie de Kerner » telle qu'elle était nommée initialement, devint le « botulisme » (du latin *botulus*, saucisse) (Dressler, 2017).

B. Identification de l'agent pathogène, le *Clostridium botulinum*

L'étape suivante fut l'identification du bacille responsable du botulisme, le *Clostridium botulinum*, par le microbiologiste Emile Pierre Marie van Ermengem. Après une nouvelle intoxication de botulisme en Belgique, Ermengem réussit à isoler le microorganisme toxique en le récupérant directement dans la viande contaminée et dans les cadavres des victimes, et à le faire croître en milieu anaérobie (Figure 2). Il fut donc le premier à isoler la structure cristalline de la neurotoxine botulique de sérotype A dont la lettre caractéristique sera donnée en 1919 par Georgina Burke. Cette dernière démontra l'existence de différentes espèces de *Clostridium botulinum* produisant des toxines sérologiquement différentes (Burke, 1919; Foster, 2014; Montecucco et al., 1996; Peng Chen et al., 2012). Ermengem donna ainsi le nom de « bacille botulique » à l'agent pathogène responsable du botulisme, qui fut ensuite rebaptisé *Clostridium botulinum*. De ses divers travaux, Ermengem conclut que, i) la toxine est produite dans les aliments par une bactérie, ii) la toxine n'est pas détruite par le processus normal de digestion après ingestion, iii) la toxine pourrait être inactivée par la chaleur, iv) toutes les espèces animales ne sont pas sensibles à la toxine (Ermengem, 1897).

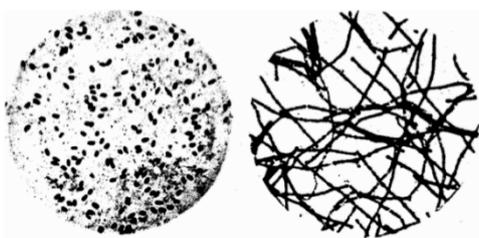


Figure 2. Microscopie de la section histologique de la viande contaminée (Ermengem, 1897)

A gauche, présence de nombreuses spores dans une section de viande contaminée. A droite, culture sur gélatine et glucose au 8^{ème} jour de bacilles botuliques matures en forme de tiges.

C. Recherches sur les neurotoxines botuliques au XX^{ème} siècle

Au début du XX^{ème} siècle, Leuchs isola une souche de toxine de haricots contaminés différente de celle précédemment isolée par Ermengem dans la viande. Il démontra que ces deux souches

étaient sérologiquement distinctes et ce deuxième sérotype de neurotoxine botulique fut qualifiée par la lettre B (Hauschild, 2018; Montecucco, 1995).

Au cours des années suivantes, de nouveaux cas de botulisme dans le monde ainsi que des progrès constants dans la compréhension de la biologie moléculaire de l'activité de la toxine ont mis en évidence que la toxine pouvait être inactivée par la chaleur, permettant ainsi d'améliorer les processus de conservation des aliments et de mise en conserve. En 1928, la neurotoxine fut isolée pour la première fois, et vingt ans plus tard sa purification et sa préparation sous forme cristalline (Lamanna et al., 1946; Sommer et al., 1926) furent mises au point. Ces processus (isolation, purification, cristallisation) ont ensuite été utilisés par Edward J. Schantz pour produire le premier lot de toxine qui servit de base aux produits thérapeutiques développés. D'autres sérotypes de toxine botulique allant de C à G furent identifiés dans le monde entier (Bengtson, 1922; Gimenez and Ciccarelli, 1972; Gunnison et al., 1936; Meyer and Gunnison, 1928; Møller and Scheibel, 2009).

En 1949, le pharmacologiste Arnold Burgen découvrit que la toxine était capable de bloquer la transmission neuromusculaire en inhibant la libération d'acétylcholine au niveau des jonctions neuromusculaires (Burgen et al., 1949). Cette découverte fondamentale généra des applications thérapeutiques diverses. C'est en 1950 que le Dr Vernon Brooks proposa pour la première fois l'utilisation médicale de la neurotoxine botulique de sérotype A dans le but de réduire les états d'hypercontractilité musculaire, mais ce n'est qu'en 1980 que l'ophtalmologue Alan Scott utilisa cette toxine pour le traitement d'un de ses patients atteint de strabisme devenant ainsi une alternative chirurgicale à ce trouble (Scott, 1981). Depuis lors, les injections de neurotoxine botulique ont démontré leur efficacité et leur sûreté dans le traitement d'un grand nombre de maladies neurologiques et non neurologiques (Jankovic and Brin, 1997).

En 1989, l'utilisation de la neurotoxine botulique de type A fut définitivement acceptée par la FDA dans le traitement du strabisme, du blépharospasme et de l'hémispasme facial de l'adulte (Brin et al., 2002). Dans les années 1990, des travaux démontrèrent l'efficacité de la toxine dans les dystonies et dans le traitement de la spasticité. Depuis, le nombre de nouvelles indications thérapeutiques n'a cessé de croître notamment pour le traitement de la spasticité des adultes et des enfants atteints d'infirmité motrice cérébrale (Chaléat-Valayer et al., 2005). Les bénéfices esthétiques d'injections sous-cutanées de neurotoxine botulique basés sur la relaxation musculaire ont été découverts et exploités commercialement par la suite (Carruthers and Carruthers, 1992). En ce sens, la FDA approuva pour la première fois en 2002 la neurotoxine botulique de sérotype A dans le

domaine de la dermatologie pour réduire les rides au niveau du front (Al-Ghamdi et al., 2015). Au fur et à mesure des années, l'utilisation de la neurotoxine botulique s'est élargie à d'autres domaines notamment l'urologie, domaine où la FDA a approuvé son utilisation pour le traitement des affections de la vessie, de l'urètre et de la prostate réfractaires aux thérapies conventionnelles (Chancellor and Smith, 2011). En parallèle de son approbation par la FDA, la neurotoxine a été approuvée par la *European Medicines Agency* (EMA) pour des applications cliniques similaires (Mitalipov and Wolf, 2006; Monheit and Pickett, 2017). Malgré la grande diversité des neurotoxines botuliques, seuls les sérotypes A et B sont actuellement utilisés pour des applications thérapeutiques. Ce point sera abordé plus précisément dans la partie II à suivre.

L'histoire de la neurotoxine botulique à usage thérapeutique ne s'arrête pas là, puisque les laboratoires académiques, les laboratoires pharmaceutiques et les cliniciens continuent non seulement d'exploiter le potentiel des toxines approuvées pour le traitement d'indications supplémentaires, mais aussi de développer de nouvelles toxines afin d'élargir le domaine d'application thérapeutique.

II. Structure et sérotypes des neurotoxines botuliques

A. Structure des neurotoxines botuliques

Les neurotoxines botuliques (BoNT) sont synthétisées de manière naturelle principalement par *Clostridium botulinum*, bactérie anaérobie à Gram positif formant des spores et agent pathogène à l'origine du botulisme (Pirazzini et al., 2017; Rossetto et al., 2014; Schiavo et al., 2000). Les BoNT sont naturellement produites sous forme d'un complexe multiprotéique appelé complexe de toxines progénitrices. Ce complexe est composé de BoNT et de plusieurs composants auxiliaires non toxines dont les protéines NTNHA (*NonToxic NonHemagglutinin*) (Gu et al., 2012; Lam and Jin, 2015; Miyashita et al., 2016). Ces protéines protègent la BoNT de la dégradation gastro-intestinale et facilitent sa transcytose à travers la barrière intestinale. Relarguée dans la circulation sanguine, la BoNT atteint les jonctions neuromusculaires et est internalisée dans les neurones. La BoNT sous sa forme libre se présente sous la forme d'un polypeptide de 150 KDa composé de deux chaînes spécifiques : une chaîne lourde (HC, *Heavy Chain*) de 100 KDa reliée à une chaîne légère (LC, *Light Chain*) enzymatiquement active de 50 KDa (Schiavo et al., 2000; Simpson, 2004) (Figure 3). Les deux chaînes sont reliées par un pont disulfure et par une boucle de l'HC qui s'enroule autour de la LC (Lacy et al., 1998; Montal, 2010).

La LC des BoNT est une métalloprotéase dont le rôle est de cliver les protéines neuronales SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor*) (Gardner and Barbieri, 2018; Peng Chen et al., 2012). Les protéines SNARE sont les composants centraux de la machinerie moléculaire eucaryote qui assure la fusion membranaire nécessaire à l'exocytose des neurotransmetteurs (Duman and Forte, 2003; Südhof and Rizo, 2011). Les neurotransmetteurs sont stockés dans des vésicules synaptiques qui fusionnent avec la membrane plasmique sous l'action calcium-dépendante des protéines SNARE. Par conséquent, le clivage des protéines SNARE neuronales par la toxine empêche la fusion des membranes ou peut entraîner la formation d'un complexe SNARE instable donc inefficace, et bloque consécutivement la libération du neurotransmetteur cholinergique, l'acétylcholine, au niveau de la jonction neuromusculaire, ce qui conduit à une neuroparalysie. Plusieurs membres de la famille des protéines SNARE neuronales ont été identifiés : la synaptobrevine ou VAMP (*Vesicle Associated Membrane Protein*), la syntaxine et la SNAP25 (*Synaptosomal Associated Protein of 25 KDa*) (Sutton et al., 1998). VAMP fait partie des SNARE dites vésiculaires ou v-SNARE, quant à syntaxine et SNAP25 ce sont des SNARE dites cible ou t-SNARE (t pour *target*) (El Far and Seagar, 2011; Söllner et al., 1993). L'interaction entre v-SNARE et t-SNARE conduit à la formation d'un complexe appelé trans-SNARE qui rapproche les membranes opposées et catalyse la fusion des vésicules avec les membranes cibles (Südhof, 2013). La HC de la toxine, elle est quant à elle responsable de la sélectivité de la liaison avec la terminaison nerveuse via son domaine C-terminal de liaison au récepteur, et participe à la translocation de la chaîne légère de la toxine à travers la membrane des vésicules endocytaires vers le cytosol neuronal (Peng Chen et al., 2012).

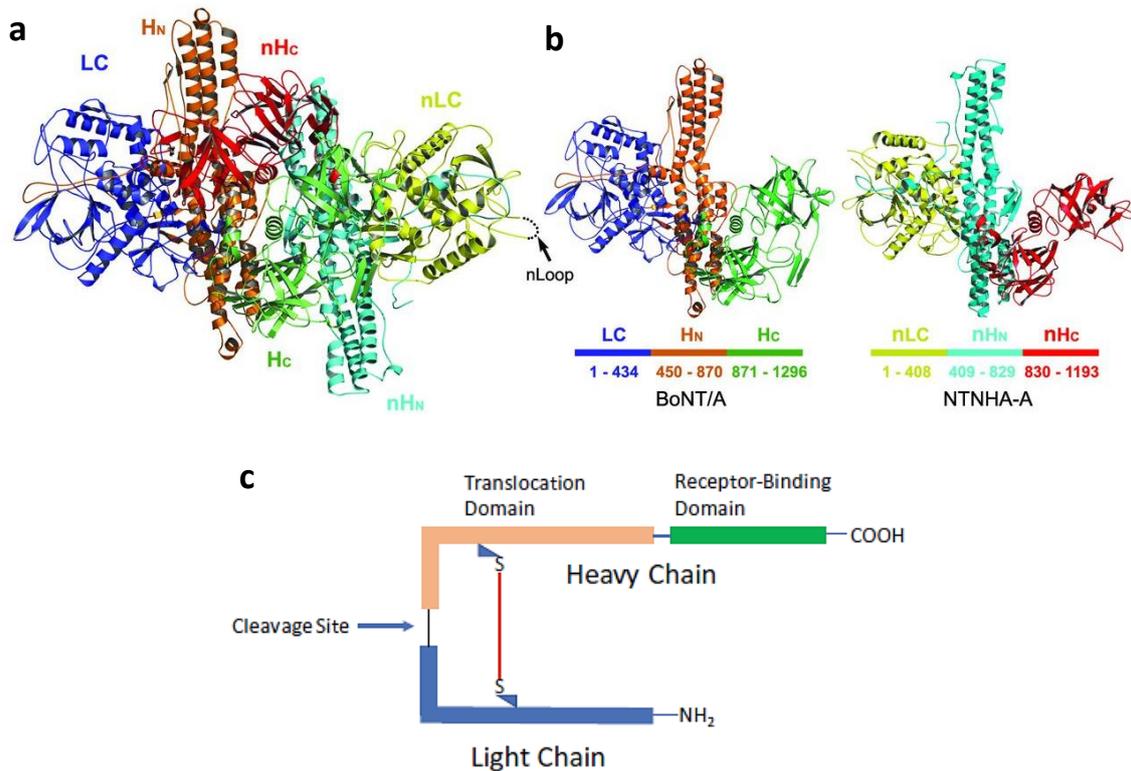


Figure 3. Structure de la BoNT de type A (Gu et al., 2012; Whitcup, 2019)

(a) La BoNT naturelle est produite sous forme d'un complexe BoNT/NTNHA. Les domaines de la BoNT/A sont présentés en bleu (LC), orange (HN) et vert (Hc). Les domaines NTNHA sont présentés en jaune (nLC), cyan (nHN) et rouge (nHc). (b) Structures individuelles des domaines BoNT/A et NTNHA. (c) La chaîne lourde et la chaîne légère sont reliées par un pont disulfure. La chaîne lourde (100 KDa) contient un domaine de liaison au récepteur et un domaine de translocation vers le cytosol. La chaîne légère (50 KDa) est responsable de l'activité endopeptidase de la BoNT et du clivage des protéines SNARE impliquées dans la fusion des vésicules au niveau de la membrane cellulaire interne.

B. Différents sérotypes de neurotoxines botuliques

Sept sérotypes de BoNT ont été clairement identifiés, notés de BoNT/A à BoNT/G, qui sont structurellement similaires mais antigéniquement distincts. Plusieurs études utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre la BoNT/A ont démontré que ces anticorps neutralisaient certains sérotypes, mais pas tous, suggérant ainsi une variabilité au sein de chaque sérotype de BoNT, qui a depuis été révélée par le séquençage de génomes entiers de *Clostridium* et de gènes individuels codant pour les BoNT (Smith et al., 2005). Les sérotypes A, B, E, F et G sont responsables du botulisme chez l'Homme, alors que les sérotypes C et D le sont chez l'animal (Collins and East, 1998; Peng Chen et al., 2012; Shapiro, 1998).

Un huitième sérotype, le sérotype H, a été identifié et caractérisé il y a quelques années comme une toxine chimérique possédant une LC catalytique similaire à celle de la BoNT/F et une HC similaire à celle de la BoNT/A (Kalb et al., 2015; Maslanka et al., 2016; Pellett et al., 2018). Plus récemment, un neuvième sérotype a été découvert, le sérotype X, dont les spécificités restent à caractériser (Masuyer et al., 2018; Zhang et al., 2017). Historiquement, la bactérie qui produit la BoNT/X a été isolée dans les années 90 suite à des cas de botulisme infantile. La souche fut dûment classée et sa toxicité attribuée à la BoNT/B. La bactérie fut séquencée et la séquence codant pour la BoNT/B fut trouvée. Cependant, en reprenant ces travaux, des chercheurs ont mis en évidence que le séquençage génomique de la bactérie était incomplet et qu'un fragment contenant un nouveau gène présentant toutes les caractéristiques d'une toxine fonctionnelle avait été manqué. La BoNT/X est la toxine possédant le moins d'homologie de séquence avec les autres sérotypes de BoNT et n'est pas reconnue par les antisérums contre les sérotypes déjà connus. Comme pour les BoNT/B/D/F/G/H, la BoNT/X clive les protéines v-SNARE, VAMP1/2/3. De façon intéressante, les recherches sur la BoNT/X ont également montré que ce nouveau sérotype était capable de cliver les protéines v-SNARE VAMP4, VAMP5 et Ykt6 (homologue VAMP).

Les sérotypes A à H présentent un degré élevé d'homologie de séquence mais diffèrent par leur spécificité de liaison et/ou d'affinité pour les récepteurs aux BoNT et pour les protéines SNARE cibles (Tableau I) (Binz et al., 1994; Blasi et al., 1993; Dong, 2006; Dong et al., 2003, 2008; Rummel et al., 2007, 2009; Schiavo et al., 1993; Stenmark et al., 2010; Tsukamoto et al., 2005; Yamamoto et al., 2012; Yao et al., 2017). Ces spécificités confèrent aux BoNT des différences de toxicité et d'efficacité en termes de paralysie musculaire, de durée des effets, et d'affinité spécifique pour la cible (Dong et al., 2007; Eleopra et al., 2020; Foran et al., 2003a; Giménez and Giménez, 1995; Ikeda et al., 2012; Poulain and Humeau, 2003; Poulain and Popoff, 2019; Singh and Kukreja, 2015; Sloop et al., 1997).

Les huit sérotypes classiques de BoNT (A à H) ciblent sélectivement la membrane présynaptique des terminaisons nerveuses, via un mode de liaison unique qui repose sur l'utilisation de deux récepteurs indépendants, un premier constitué de polysialogangliosides (PSG) et un récepteur protéique au niveau de la vésicule synaptique. Les PSG sont des glycosphingolipides contenant de l'acide sialique qui sont les plus abondants dans le système nerveux. Ils sont impliqués dans la modulation des protéines membranaires et des canaux ioniques, dans la signalisation cellulaire et dans la communication entre les cellules (Yu et al., 2011). Au niveau des membranes neuronales, les PSG les plus communs sont le GT1b, le GD1a, le GD1b et le GM1 (Schnaar, 2016;

Sturgill et al., 2012). La liaison de la toxine aux PSG accumule la toxine sur la surface terminale nerveuse et facilite ainsi son interaction avec un récepteur protéique (Hamark et al., 2017; Rummel, 2016). Deux types de récepteurs protéiques aux BoNT ont été identifiés à ce jour : trois isoformes de la protéine SV2A (SV2A/B/C, *Synaptic Vesicle protein 2*) et deux isoformes de la protéine Syt (Syt-I/II, synaptotagmine). Ces deux types de récepteurs sont impliqués dans la modulation calcium-dépendante de la libération des neurotransmetteurs (Kwon and Chapman, 2012).

Tableau I : Caractéristiques des différents sérotypes de BoNT

Sérotipe	Récepteur aux BoNT	Protéine SNARE cible	Durée d'action (Homme)
A	SV2A, SV2B, SV2C	SNAP25	3-6 mois
B	Syt-I, Syt-II	VAMP	2 mois
C	GD1b, GT1b uniquement	SNAP25, Syntaxine	3-4 mois
D	SV2A, SV2B, SV2C	VAMP	NR
E	SV2A, SV2B	SNAP25	< 4 semaines
F	SV2A, SV2B, SV2C	VAMP	1-2 mois
G	Syt-I, Syt-II	VAMP	NR
H	SV2A, SV2B, SV2C	VAMP	NR
X	NR	VAMP1/2/3/4/5, Ykt6	NR

SV : *synaptic vesicle protein* ; Syt: synaptotagmine ; GD/GT : gangliosides ; SNAP25 : *synaptosomal-associated protein 25 KDa* ; VAMP : *vesicle-associated membrane protein* ; NR : non renseigné

III. Mécanisme d'action des neurotoxines botuliques

Physiologiquement, la transmission neuromusculaire débute lorsqu'une impulsion nerveuse provenant du système nerveux périphérique ou central atteint la membrane présynaptique neuronale de la jonction neuromusculaire (JNM) sous forme de potentiel d'action (Martyn et al., 2009). Ce dernier déclenche l'ouverture de canaux calciques (Ca^{2+}). L'augmentation de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire entraîne un changement de conformation du complexe SNARE induisant la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane neuronale et l'exocytose de leur contenu, à savoir l'acétylcholine (ACh), dans la fente synaptique. L'ACh libérée traverse la fente synaptique et se lie à son récepteur nicotinique à la surface de la fibre musculaire, ce qui déclenche l'ouverture du récepteur-canal et génère un potentiel d'action se propageant dans la fibre musculaire pour la faire se contracter (Duman and Forte, 2003). La BoNT inhibe la libération du neurotransmetteur cholinergique induisant une neuroparalysie, par un processus se divisant en quatre étapes : liaison de la toxine à la membrane présynaptique du neurone moteur, internalisation

de la toxine dans les vésicules d'endocytose, translocation de la LC dans le cytosol et clivage de la protéine SNARE cible. Ces étapes sont illustrées dans la figure 4 et détaillées dans les parties suivantes (Davies et al., 2018; Dressler and Adib Saberi, 2005; Peng Chen et al., 2012; Poulain and Popoff, 2020; Rossetto et al., 2014; Schiavo et al., 2000; Simpson, 2004; Tighe and Schiavo, 2013).

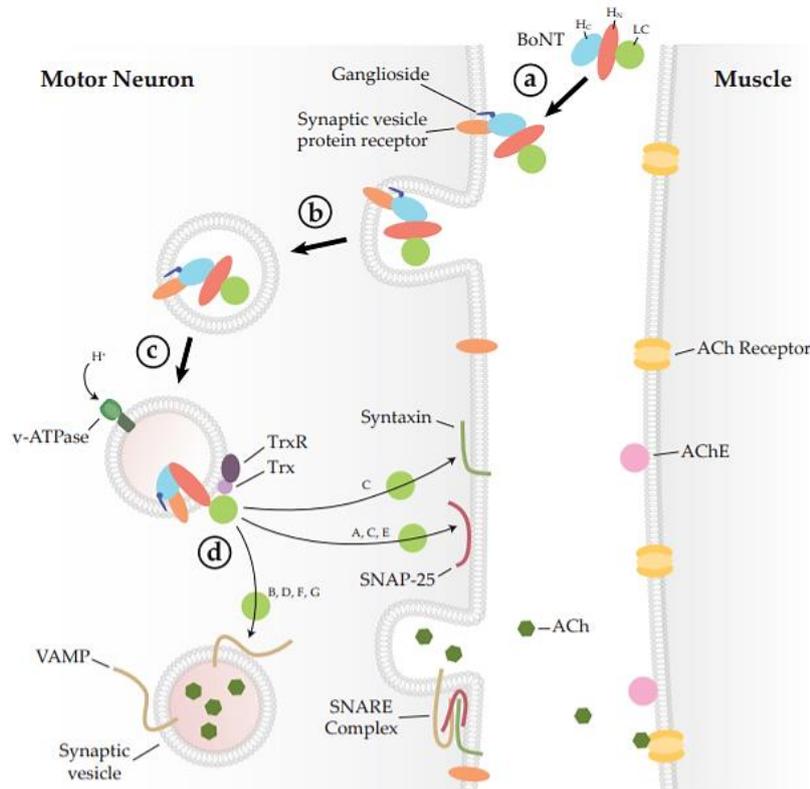


Figure 4. Mécanisme d'action de la BoNT au niveau de la jonction neuromusculaire (Davies et al., 2018)

La BoNT se lie à la membrane présynaptique du neurone moteur par un complexe à double récepteurs (a), qui est ensuite endocyté à l'intérieur du neurone via la vésicule d'endocytose (b). La chaîne légère (LC) de la toxine est transloquée hors de la vésicule suite à son acidification, ce qui provoque le changement de conformation de la LC (c). La thiorédoxine liée à la membrane de la vésicule permet la libération de la LC dans le cytoplasme où elle clive sa protéine SNARE cible (d). Le clivage des SNARE entraîne l'inhibition de la fusion membranaire et la libération de l'ACh, provoquant l'arrêt de la contraction musculaire.

ACh : acétylcholine ; AChE : acétylcholine estérase ; Trx : thiorédoxine ; TrxR : thiorédoxine réductase.

A. Liaison de la toxine à la membrane présynaptique neuronale

La première étape de l'intoxication de la BoNT est sa liaison à la membrane présynaptique du neurone cible, c'est-à-dire le neurone moteur au niveau de la JNM (Figure 5). Comme décrit précédemment, la liaison à haute affinité des toxines implique un complexe à double récepteurs

composé d'un PSG et d'un récepteur protéique spécifique (SV2A/B/C ou Syt-I/II) dépendant du sérotype de BoNT, qui sont tous deux structurellement séparés.

SV2 et Syt font partie intégrante de la membrane des vésicules synaptiques. Leur site de liaison à la toxine est exposé au niveau du lumen de la vésicule synaptique et non à la surface de la terminaison nerveuse, contrairement au PSG. De ce fait, ces deux récepteurs sont rendus inaccessibles à la toxine. Au cours de la fusion de la vésicule synaptique avec la membrane présynaptique neuronale, le lumen de la vésicule synaptique se retrouve exposé à l'environnement extracellulaire, permettant ainsi de rendre accessible SV2 et Syt à la toxine. La BoNT peut alors se lier à son récepteur protéique spécifique et être internalisée à l'intérieur du neurone (Dong, 2006; Rossetto, 2018; Rossetto et al., 2014).

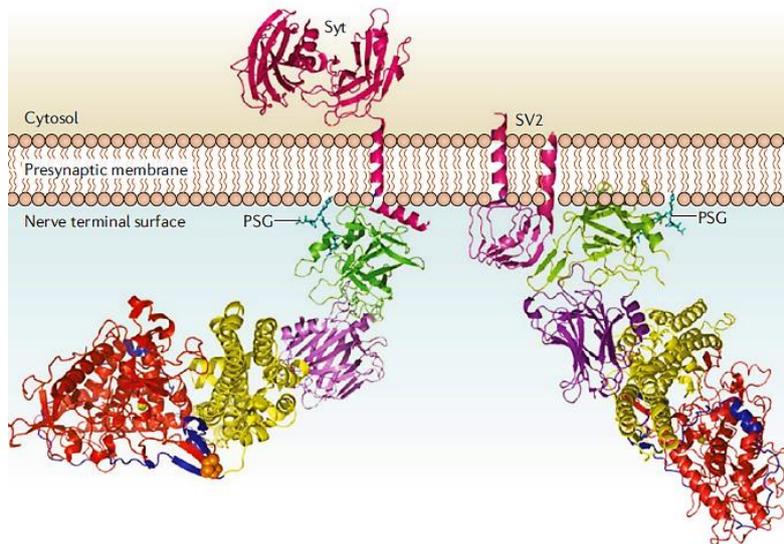


Figure 5. Liaison de la BoNT à la membrane présynaptique neuronale (Rossetto et al., 2014)

La chaîne lourde de la BoNT se lie à un ganglioside présent sur la membrane présynaptique du neurone, suivi de sa liaison à l'un des récepteurs protéiques spécifiques SV2 ou Syt (suivant le sérotype de la toxine) localisés respectivement au niveau de la membrane présynaptique ou à l'intérieur de la vésicule synaptique.

B. Internalisation et translocation de la toxine dans les terminaisons neuronales

La double liaison de la toxine avec le PSG et le récepteur SV2 ou Syt augmente l'interaction de la toxine avec la membrane présynaptique, rendant cette interaction irréversible à ce stade (Montecucco et al., 2004). Le recyclage par endocytose des vésicules synaptiques provoque l'internalisation de la BoNT à l'intérieur du neurone. D'autres voies d'endocytoses peuvent également

entraîner l'internalisation de la BoNT (Harper et al., 2016). La toxine se retrouve ainsi encapsulée dans le lumen des vésicules synaptiques migrant dans le cytoplasme du neurone (Colasante et al., 2013). A ce stade, la toxine n'a pas d'activité biologique car elle est confinée à l'intérieur des vésicules. L'acidification des vésicules générée par les pompes à protons conduit à un changement de conformation de la toxine, entraînant la perte de son atome de zinc au niveau du site catalytique. Le domaine de translocation de la HC s'insère dans la bicouche lipidique de la membrane de la vésicule synaptique permettant la formation d'un canal membranaire. Parallèlement, le pont disulfure reliant la LC et la HC de la toxine se réduit, et les deux chaînes se séparent permettant à la LC d'atteindre le cytoplasme via le canal membranaire (Montecucco et al., 1989; Schiavo et al., 2000). La réduction chimique de la liaison disulfure est due à l'action du système thioredoxine réductase (TrxR) - thioredoxine (Trx) (Pirazzini et al., 2013, 2014). La LC retrouve ensuite sa structure tertiaire et réacquiert son atome de zinc essentiel à son activité catalytique.

C. Inhibition de la libération des neurotransmetteurs

Après avoir été libérée dans le cytosol, la LC de la toxine clive les liaisons peptidiques des protéines SNARE (SNAP25, VAMP ou syntaxine) à des sites bien spécifiques en fonction du sérotype de la BoNT (Figure 6). Les protéines SNARE deviennent alors non fonctionnelles. Le clivage des protéines SNARE empêche l'amarrage de la membrane de la vésicule à la membrane synaptique neuronale empêchant ainsi la fusion des membranes. La libération de l'acétylcholine dans la fente synaptique est alors bloquée, et la transmission de l'influx nerveux du neurone moteur au muscle inhibée. Cela conduit à l'altération de la contraction du muscle et donc à la perte du tonus musculaire. Bien que la neurotransmission soit inhibée, la toxine n'entraîne aucune dégénérescence axonale. De plus, la toxine est capable d'inhiber la libération de neurotransmetteurs provenant de divers systèmes synaptosomaux et neuronaux (autres que les neurones moteurs) (Bozzi et al., 2006; Duchesne de Lamotte et al., 2021; Pellett et al., 2019), dont plusieurs cellules neuroendocrines (Boyd et al., 1995; Couesnon et al., 2012).

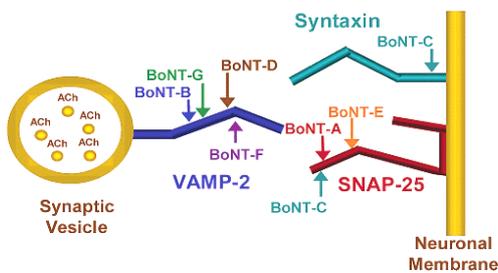


Figure 6. Clivage des protéines SNARE dépendant du sérotype de BoNT (Boyer et al., 2005)

Les BoNT/A/E coupent la protéine SNAP25, la BoNT/C coupe les protéines SNAP25 et syntaxine qui sont situées sur la face cytosolique de la membrane neuronale. Les BoNT/B/D/F/G coupent la protéine VAMP2 située sur la face cytosolique des vésicules synaptiques.

La durée du blocage de la libération de l'acétylcholine varie en fonction du sérotype de BoNT considéré (longue pour la BoNT/A et rapide pour la BoNT/E), ainsi que de la durée de vie intracellulaire de la LC (Foran et al., 2003a). En effet, tant que l'intégralité des molécules de LC de toxine n'est pas éliminée du cytosol neuronal, le phénomène de clivage des protéines SNARE reste présent

D. Réversibilité d'action de la neurotoxine botulique

L'inhibition de la libération des neurotransmetteurs par la BoNT est temporaire et réversible. Bien que la JNM soit inactivée, elle n'est pas pour autant détruite, et la terminaison synaptique d'origine connectée au muscle reste intacte. La neurotransmission peut donc être rétablie (Aoki and Guyer, 2001). En effet, un phénomène de germination des terminaisons synaptiques est observé au niveau de la JNM après une inhibition prolongée. Ce phénomène de germination des terminaisons nerveuses axonales, appelé « sprouting », permet la genèse de nouvelles synapses, ce qui entraîne le renouvellement du pool de vésicules synaptiques et donc une récupération fonctionnelle de la JNM au bout de plusieurs semaines (Angaut-Petit et al., 1990; Holland and Brown, 1981; de Paiva et al., 1999; Pamphlett, 1989) (Figure 7). Le réseau de germination continue ensuite de s'étendre plusieurs semaines après le rétablissement fonctionnel de la neurotransmission. Une fois la capacité maximale de libération de neurotransmetteurs rétablie par la terminaison nerveuse principale, le réseau de germination perd son activité et finit par être éliminé (Foran et al., 2003b). Par ailleurs, les fibres musculaires post-synaptiques sont capables d'exprimer de nouveaux récepteurs cholinergiques (AChR) à proximité des nouvelles terminaisons nerveuses.

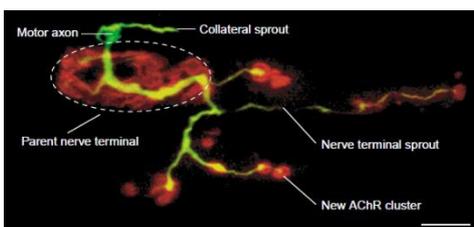


Figure 7. Phénomène de « sprouting » à la JNM après injection de BoNT (Foran et al., 2003b)

Des bourgeons synaptiques émergent de la terminaison nerveuse principale dont la neurotransmission a été bloquée par la toxine.

IV. Neurotoxines botuliques et thérapeutique

L'utilisation en clinique des BoNT est un excellent exemple de valorisation de substances naturelles en thérapeutique. En effet, bien qu'elle soit considérée comme l'une des neurotoxines les plus puissantes connues ; la dose létale a été estimée chez l'Homme à 0,1-1 ng/Kg si administrée par voie intraveineuse et 1 µg/Kg par voie orale ; la BoNT est devenue au cours des années un agent thérapeutique efficace pour de nombreuses indications lorsqu'elle est injectée localement (Escher et al., 2017; Fonfria et al., 2018; Jabbari, 2016; Johnson, 1999; Pelletier-Cameron and Cox, 2014; Satriyasa, 2019; Shibasaki et al., 2009). Du fait de leur importante affinité pour les neurones et leur efficacité de clivage, une faible quantité de toxine suffit à atténuer l'activité des neurones cibles. De ce fait, les patients recevant des injections répétées de toxine ne génèrent des anticorps neutralisants qu'après plusieurs années de traitement (Lacroix-Desmazes et al., 2017). Aussi, la durée d'action prolongée des toxines chez l'Homme ; à titre d'exemple, une injection de BoNT/A chez l'Homme suffit pour maintenir un effet thérapeutique jusqu'à 6 mois ; est particulièrement bénéfique pour les applications médicales qui nécessitent des procédures invasives comme le traitement de la vessie hyperactive. La durée d'action de la BoNT variant en fonction du sérotype, le choix approprié du sérotype de toxine, de la dose et du site d'administration sont des déterminants essentiels d'une réponse positive au traitement (Dong et al., 2019; Rasetti-Escargueil and Popoff, 2020).

Au-delà de leur utilisation thérapeutique pour soulager les troubles du mouvement tels que la dystonie et la spasticité (Fonfria et al., 2018), des études ont mis en évidence un effet différentiel des toxines sur les neurones excitateurs et inhibiteurs, ce qui constitue une approche thérapeutique unique dans la modulation neuronale (Kumar et al., 2016). Dans ce contexte, la toxine a été approuvée dans le traitement des migraines chroniques grâce à son effet analgésique impactant entre autre sur la libération des neurotransmetteurs et des peptides inflammatoires (Aurora et al., 2011; Burstein et al., 2014). Par ailleurs, il a été démontré que l'injection de BoNT permet également de réguler des troubles tels que l'hypersécrétions glandulaires (hyperhidrose ou sialorrhée) (Laing et al., 2008).

Actuellement, malgré la diversité des sérotypes de BoNT, seuls les sérotypes A et B sont utilisés et commercialisés en esthétique (Blitzer and Binder, 2002; Frevert, 2015) et en thérapeutique (Fonfria, 2018; Peng Chen et al., 2012). Il existe quatre produits de BoNT approuvés par la FDA pour plusieurs applications cliniques (Tableau II).

L'injection sous-cutanée de la toxine est la procédure esthétique la plus couramment pratiquée et la plus populaire dans le monde aujourd'hui (Dorizas et al., 2014). La demande d'utilisations esthétiques des BoNT étant croissante, de nouvelles zones d'injection au niveau du visage, autres que le front et le contour des yeux, sont en cours d'investigation (Gart and Gutowski, 2016; Gendler and Nagler, 2015).

Tableau II : BoNT disponibles dans le commerce

Nom commercial	Sérotype	Indications approuvées par la FDA	Date
DYSPORE[®] (Abobotulinumtoxin)	A	Dystonie cervicale	2009
		Rides glabellaires	2009
		Spasticité des membres supérieurs	2015
		Spasticité des membres inférieurs (enfants)	2016
		Spasticité des membres inférieurs (adultes)	2017
		Spasticité (enfants)	2020
BOTOX[®] (Onabotulinumtoxin)	A	Blépharospasme	1989
		Strabisme	1989
		Dystonie cervicale	2000
		Rides glabellaires	2002
		Hyperhidrose	2004
		Spasticité des membres supérieurs (adultes)	2010
		Migraine chronique	2010
		Vessie hyperactive neurogène	2011
		Incontinence urinaire	2011
		Vessie hyperactive idiopathique	2013
		Spasticité des membres inférieurs (adultes)	2016
		Spasticité des membres (enfants)	2019
		Spasticité (enfants)	2020
XEOMIN[®] (Incobotulinumtoxin)	A	Blépharospasme	2010
		Strabisme	2010
		Dystonie cervicale	2010
		Rides glabellaires	2011
		Spasticité des membres supérieurs	2015
		Sialorrhée/bave excessive	2018
		Blépharospasme/Clignement involontaire	2019
		Sialorrhée chronique	2020
MYOBLOC/NEUROBLOC[®] (Rimabotulinumtoxin)	B	Blépharospasme	2010
		Strabisme	2010
		Dystonie cervicale	2010
		Rides glabellaires	2011
		Sialorrhée chronique	2019

Le nombre d'indications traitées par les BoNT ne cesse de croître depuis sa première utilisation en 1980. De nombreuses études sont en cours actuellement afin d'étudier l'efficacité non

seulement des sérotypes de BoNT déjà commercialisés mais également des BoNT d'autres sérotypes ou bien de BoNT modifiés pour diverses conditions (Fonfria, 2018; Lim and Seet, 2010; Cooper, 2007) (Tableau III). Dans le domaine de la douleur, l'étude de l'utilisation thérapeutique des BoNT pour ses propriétés anti nociceptives est en pleine expansion. La toxine inhibe la libération des médiateurs de la douleur tels que le glutamate, la substance P et le peptide relié au gène calcitonine (CGRP ou *Calcitonin Gene-Related Peptide*), en altérant la fusion des vésicules synaptiques et en modulant l'activité de certains récepteurs transmembranaires tels que les TRP (*Transient Receptor Potential*) qui détectent des stimuli thermiques et chimiques pour activer les neurones sensoriels pour produire une douleur (Aoki and Francis, 2011; Julius, 2013; Kim et al., 2015; Park and Park, 2017).

Tableau III : Nouvelles indications pour lesquelles les BoNT sont à l'étude

Spécialité	Exemples d'indications
Cardiologie	Flutter atrial, Arythmie ventriculaire
Chirurgie thoracique	Achalasie
Dentisterie	Bruxisme
Dermatologie	Alopécie, Psoriasis
Endocrinologie	Obésité
Gastroentérologie	Anisme, Constipation, Gastroparésie
Gynécologie	Endométriose, Vaginisme
Neurologie	Dysréflexie autonome, Polyneuropathies, Neuromyotonie, Tremblements, Tics
Otolaryngologie	Dysphonie
Orthopédie	Pied-bot, Tennis-elbow, Syndrome du piriforme
Psychiatrie	Dépression
Rhumatologie	Syndrome de douleur myofasciale
Urologie	Infection urinaire, Hyperplasie bénigne de la prostate

V. Modèles d'études des neurotoxines botuliques

Au-delà du domaine thérapeutique, les activités de recherche sur les BoNT sont réalisées dans les domaines de la bio-défense, le diagnostic et le traitement du botulisme, ainsi que la recherche fondamentale et appliquée. Détecter et quantifier la toxine en utilisant des modèles de détection et méthodologies pertinents est donc essentiel pour tous ces domaines. Dans ce contexte, il est important de comprendre le potentiel et les limites des différents modèles et méthodes de détection utilisés pour l'étude des BoNT.

A. Modèles d'études *in vivo* de rongeurs

1. « Mouse BioAssay »

Le « Mouse BioAssay » (MBA) a été le premier test fonctionnel développé pour la détection des BoNT et la détermination de son activité par John Trevan en 1927 (Trevan, 1927). Ce test est aujourd'hui le plus couramment utilisé pour détecter et confirmer la présence des BoNT dans des échantillons cliniques, alimentaires et environnementaux liés à des foyers de botulisme (Dorner et al., 2012; Ferreira et al., 2004; Stern et al., 2018).

La procédure consiste à injecter par voie intrapéritonéale ou intraveineuse des échantillons de nourriture potentiellement contaminés par la toxine chez la souris. Les souris sont ensuite surveillées afin de détecter les symptômes typiques du botulisme, pouvant survenir entre quatre à six jours, tels que l'insuffisance respiratoire, la faiblesse des membres, jusqu'à la paralysie totale et la mort (Dorner et al., 2012; Rasooly and Do, 2008; Stern et al., 2018). L'activité des toxines est définie en unités DL₅₀ (dose létale 50), c'est-à-dire la quantité de toxine nécessaire pour tuer 50% de la population étudiée (Pearce et al., 1994). Cette méthode permet de détecter un large éventail de sérotypes de BoNT décrits dans la littérature, grâce à un test de neutralisation basé sur l'utilisation d'anticorps spécifiques de chacun des sérotypes (A à G), ce qui est essentiel pour le diagnostic clinique (Cheng et al., 2016; Peck et al., 2017), et offre un haut niveau de sensibilité, détectant jusqu'à 10 pg/mL de BoNT/A à G (Dunning et al., 2014; Hobbs et al., 2019; Nepal and Jeong, 2020).

Cependant, le MBA présente plusieurs limitations. Premièrement, il s'agit d'une méthode coûteuse car nécessitant des locaux dédiés et adaptés aux animaux, longue car pouvant demander plusieurs semaines d'observation et qui requiert un personnel qualifié. Deuxièmement, ce test exige l'utilisation d'un nombre conséquent d'animaux et nécessite de les exposer à la douleur et à la détresse en raison de la nature du test, ce qui soulève des préoccupations éthiques (Adler et al., 2010; Pellett, 2013; Wilder-Kofie et al., 2011). De plus, les différences inter-espèces entre les souris et les humains peuvent conduire à des interprétations erronées des résultats. Par exemple, dans le cas de la BoNT/B, la puissance de la toxine est plus élevée chez la souris que chez l'homme en raison d'une différence de résidus dans le récepteur Syt-II, résultant d'une affinité de liaison plus faible de la BoNT/B pour le Syt-II humain (Elliott et al., 2019; Tao et al., 2017). De la même façon, les BoNT/C et BoNT/D sont actives chez les animaux mais n'affectent pas l'Homme (Cobb et al., 2002; Woudstra et al., 2012).

Enfin, il a été estimé que le taux d'erreur lié au test pouvait atteindre la valeur de 40% en raison de la variabilité des résultats qui dépend en partie de l'expérimentateur, du laboratoire, de l'âge des souris, et des facteurs physiologiques ou immunitaires (Sesardic et al., 2003; Stern et al., 2018). Ceci est en partie dû au fait qu'après l'entrée de la toxine dans l'organisme, plusieurs facteurs physiologiques ou immunitaires innés pourraient diminuer la puissance ou l'activité de la fraction de toxine non internalisée. Cela pourrait donc diminuer la probabilité d'une détection ultérieure par le MBA, bien que le botulisme ait été conféré (Thirunavukkarasu et al., 2018). Les limitations de ce test ont ainsi conduit à trouver des modèles d'étude alternatifs pour remplacer, réduire ou affiner l'utilisation des animaux dans les essais (Adler et al., 2010).

2. "Digit Abduction Score" ou DAS

Une des approches alternatives de mesure de la puissance de la toxine appelé le « Digit Abduction Score » (DAS) a été développé. Cette nouvelle approche, initialement réalisée chez la souris, permet de mesurer après injection de BoNT dans un des muscles du membre in postérieur la paralysie locale du muscle induite par la toxine au travers de l'écartement des doigts de l'animal (Aoki, 1999; Broide et al., 2013). La toxine injectée provoque une réduction proportionnelle à la dose de BoNT, et le degré de la réponse est mesuré selon une échelle allant de 0 à 4 (Figure 8).

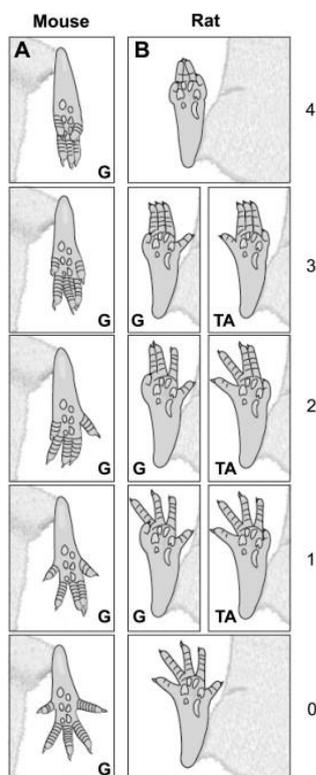


Figure 8. Réponse au DAS de la souris et du rat après injection de BoNT/A (Broide et al., 2013)

L'échelle de DAS est indiquée à droite (de 0 à 4). La valeur 0 correspond à une abduction normale des doigts, la valeur 4 correspond à une réduction maximale de l'abduction des doigts. De façon intéressante, les rats injectés présentent deux schémas de DAS en fonction du lieu d'injection, soit le muscle gastrocnémien (G), soit le muscle tibial antérieur (TA).

Cette technique s'est également développée chez le rat, ce qui confère certains avantages par rapport à l'utilisation des souris. En raison de leur taille, il est plus facile d'injecter des BoNT dans l'un des muscles des membres postérieurs du rat : le muscle tibial antérieur ou le muscle gastrocnémien, responsables de la flexion et de l'extension de la cheville respectivement (Armstrong and Phelps, 1984; Cornet et al., 2020a). Cela peut aider à comprendre les mécanismes qui régissent la diffusion, la propagation de la toxine à partir du site d'injection, et la paralysie musculaire (Hsu et al., 2004; Ramirez-Castaneda et al., 2013; Shaari et al., 1991). Des études réalisées ont démontré que la cinétique de durée de BoNT/A dans le DAS du rat était environ deux fois plus longue que dans le DAS de la souris, conférant au modèle de rat une plus grande flexibilité pour l'évaluation des mécanismes de diffusion des BoNT et de la paralysie musculaire (Broide et al., 2013). Le DAS est une approche relativement facile à réaliser et ne nécessite pas d'équipement spécialisé. Cependant, l'étroite échelle de score (de 0 à 4) réduit la puissance statistique du test et comporte un risque de biais de l'expérimentateur.

3. "Dynamic Weight Bearing" ou DWB

Une autre alternative au MBA a été récemment mise au point pour évaluer les propriétés des BoNT suite à l'administration intramusculaire chez l'animal, dans le but d'obtenir des mesures quantitatives et objectives de l'activité des toxines. Il s'agit du « Dynamic Weight Bearing » (DWB) qui mesure la différence de poids exercé par chaque patte du rongeur sur une surface dotée de capteurs permettant aux rongeurs de se déplacer librement sans interférence de l'expérimentateur (Ängeby Möller et al., 2018; Cornet et al., 2020b; Quadros et al., 2015; Tétreault et al., 2011).

Le DWB permet d'analyser les changements de la démarche des rongeurs dus à l'affaiblissement musculaire induit par une injection de BoNT. Les études réalisées sur des animaux ayant reçu des injections intramusculaires de BoNT/A ont révélé que ce test permettait la détection de quantités de toxine de l'ordre du picogramme. Les rongeurs ont présenté une réduction de leur poids mais aussi de la surface du membre injecté au niveau de la zone de contact liée à la dose de toxine (Cornet et al., 2020b). Dans cette étude, la réduction de la surface du membre injecté au niveau de la zone de contact observée a été comparée au test de DAS qui indiquait un changement seulement modéré de l'écartement des doigts lié à la dose, démontrant l'efficacité et la sensibilité plus accrue du DWB.

B. Modèles d'études *ex vivo* de rongeurs

Afin de compléter les études précédemment décrites basées sur l'utilisation de modèles *in vivo*, des modèles d'organes isolés, dits *ex vivo* ont été développés. Ces tests consistent à isoler un explant de tissu dans un bain physiologique, d'y appliquer une stimulation électrique et de mesurer de manière continue la force de contraction de l'explant. Le test le plus communément utilisé pour caractériser les BoNT est le « Phrenic Nerve HemiDiaphragm » (PNHD) et est réalisé sur une préparation comprenant une portion de nerf phrénique et d'hémidiaphragme de rongeur dans laquelle la JNM est préservée. Ce test consiste à mesurer la force de la contraction musculaire de l'hémidiaphragme après stimulation électrique du nerf phrénique (Bigalke and Rummel, 2015; Dressler et al., 2005; Rasetti-Escargueil et al., 2011; Zanetti et al., 2018) (Figure 9). Après l'ajout de toxine dans le bain contenant la préparation tissulaire, la demie-vie paralytique (t_{50}), durée nécessaire pour la réduction de la moitié du signal de force de contraction, est mesurée. Le PNHD permet la détection de 30 à 50 pg/mL de BoNT/A/B/E (Bigalke and Rummel, 2015; Nepal and Jeong, 2020). Outre la quantification de l'activité de la toxine, ce test est également utilisé pour détecter les anticorps contre les BoNT (Dressler et al., 2005; Rasetti-Escargueil et al., 2009, 2011). Récemment, un test *ex vivo* a été développé sur des préparations de vessies permettant d'évaluer l'effet de différents sous-types de BoNT sur les muscles (Maignel-Ludop et al., 2017).

Si l'ensemble de ces essais *ex vivo* permettent de déchiffrer le mécanisme d'action des BoNT dans des conditions physiologiques, ils présentent quelques limitations. En effet, il apparaît important de trouver les composants les plus adaptés pour le bain où sont plongés les explants isolés, dans le but de limiter les interférences de la matrice avec les composants des échantillons isolés. De plus, bien que ces tests puissent remplacer le MBA, ils restent basés sur l'utilisation d'animaux, même si leur nombre est réduit ainsi que la souffrance infligée, et nécessitent une certaine technicité et des instruments coûteux.

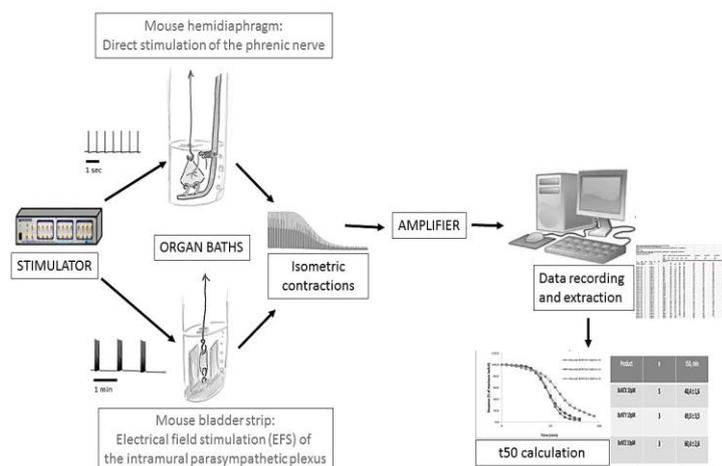


Figure 9. Dispositif expérimental *ex vivo*

Les tissus sont placés dans des bains. Les contractions de l'hémidiaphragme sont obtenues par stimulation directe du nerf phrénique, tandis que les contractions des bandes de vessie de la souris sont induites par dépolarisation du plexus intramural avec création d'un champ électrique. Les contractions sont suivies pendant plusieurs heures, avant et après ajout de toxines dans les bains. Le temps de demi-paralysie est calculé, pour chaque toxine à chaque concentration. (Source interne IPSEN)

C. Modèles d'études cellulaires

Ces dernières années des progrès significatifs ont été réalisés dans la détection et l'évaluation de la puissance des BoNT grâce aux développements de nouveaux modèles *in vitro*. Les essais *in vitro* développés sont basés sur l'utilisation de lignées neuronales sensibles aux BoNT (NBA, *Neuronal Cell-Based Assay*) qui permettent de mesurer l'activité et le mécanisme d'action de la toxine dans sa totalité : la liaison, l'absorption, la translocation et le clivage des substrats intracellulaires (Kiris et al., 2014; Pellett, 2013). Dans ce contexte, plusieurs études ont mis en évidence que les neurones étaient sensibles aux toxines (Duchesne de Lamotte et al., 2021; Elliott et al., 2019; Nicoleau et al., 2018a; Pellett et al., 2015, 2019; Schenke et al., 2020; Whitemarsh et al., 2012). Le NBA est aujourd'hui considéré comme la meilleure alternative aux tests utilisant les animaux. Un tel essai offre un modèle sensible et pertinent pour l'étude des BoNT, pouvant détecter jusqu'à 3 pg/mL de BoNT/A/B/E (Nepal and Jeong, 2020; Rust et al., 2017).

Quel que soit la source des cellules, tous les tests cellulaires jusqu'à maintenant développés nécessitent l'incubation des cellules avec les BoNT pendant une période définie (de 24h à 72h pour observer un effet maximal de la toxine), suivie de l'élimination de la toxine et d'un critère spécifique et quantitatif pour déterminer l'activité des toxines. Le critère principalement mesuré est le clivage de la protéine SNAP25 qui peut être évalué dans tous les types de cellules neuronales via des lysats cellulaires par western-blot (Rhéaume et al., 2015; Yadirgi et al., 2017; Zanetti et al., 2017), par ELISA (Doellgast et al., 1993; Rasooly and Do, 2008), et par immunofluorescence (Kiris et al., 2011; Rhéaume et al., 2015; Zanetti et al., 2017).

1. Cellules immortalisées

Les lignées cellulaires immortalisées sont relativement faciles à entretenir, peuvent être produites en grande quantité, sont capables de croître de façon illimitée en culture, et sont peu coûteuses (Escargueil et al., 2011; Kiris et al., 2014; Ray, 1993; Rust et al., 2017).

Parmi les lignées immortalisées considérées comme des modèles efficaces pour étudier l'activité biologique des BoNT, figurent les cellules Neuro-2a issues de neuroblastome de souris (Yowler et al., 2002), les cellules SH-SY5Y issues de neuroblastome humain (Purkiss et al., 2001), les cellules PC-12 issues de phéochromocytome de rat (Basavanna et al., 2013), et les cellules SiMa issues de neuroblastome humain (Fernández-Salas et al., 2012). Malgré le nombre conséquent d'études sur les BoNT utilisant ces lignées, l'utilisation de ces modèles cellulaires immortalisés soulève plusieurs limitations : ces lignées sont dérivées de cellules cancéreuses et leur profil d'expression génétique peut affecter leur sensibilité aux BoNT et leur activité cellulaire (Pellett, 2013). Cette hétérogénéité de sensibilité entre les différentes lignées immortalisées peut résulter de variations de l'expression des récepteurs, des substrats et de la machinerie cellulaire par rapport aux essais *in vivo* (Kiris et al., 2014).

2. Cellules primaires neurales

Les cultures de neurones primaires utilisées pour tester les BoNT peuvent être générées à partir de différents tissus dont la moelle épinière (Restani et al., 2012), le ganglion de la racine dorsale (Stahl et al., 2007), l'hippocampe (Kroken et al., 2017) et le cortex (Pier et al., 2011). Ces cultures primaires sont issues d'origines différentes, principalement d'embryons de rongeurs ou poulet et de rongeurs adultes (Sheridan et al., 2005; Stahl et al., 2007).

Contrairement aux lignées immortalisées, les cellules primaires ont la capacité de se différencier en neurones exprimant l'ensemble des molécules nécessaires à l'intoxication de tous les sérotypes de BoNT (récepteurs et substrats). Ainsi, les neurones primaires provenant des embryons présentent une sensibilité supérieure à la toxine que les lignées cellulaires immortalisées (Keller et al., 2004; Stahl et al., 2007; Whitemarsh et al., 2013). Parmi les autres avantages de ces modèles figurent le fait que les neurones primaires peuvent être maintenus pendant de longues périodes en culture pour étudier les effets de BoNT dans un milieu sans sérum optimisé, qui empêche la prolifération des cellules non neuronales (Kivell et al., 2001; Pellett et al., 2007), et qu'ils sont également relativement peu coûteux.

Malgré ces avantages, l'utilisation de neurones primaires présente certaines limitations. En effet, ils nécessitent le sacrifice d'un grand nombre d'animaux en gestation. Une autre limitation est la difficulté à générer des cultures homogènes en raison de variabilités inter-embryonnaires appuyées par un fond génétique différent en fonction de l'espèce d'origine, qui peuvent entraîner des différences de durée de sensibilité aux BoNT. Par ailleurs, des différences liées aux espèces ont été observées, mettant en évidence que l'expression des récepteurs aux BoNT et/ou les protéines SNARE pouvaient différer d'une espèce à l'autre (Peng et al., 2012). Il est important de rappeler que l'activité spécifique des sérotypes de BoNT est couramment déterminée par les tests biologiques sur les rongeurs, et les résultats générés ne permettent donc pas nécessairement de prédire l'activité des BoNT chez l'humain. Ces observations s'illustrent par la puissance différentielle des sérotypes A et B chez l'Homme, possiblement due à une variation de la séquence d'acides aminés entre le récepteur Syt-II chez la souris ou le rat par rapport à l'humain, sensible à l'intoxication de la BoNT/B et de la BoNT/G (Dressler and Benecke, 2007; Elliott et al., 2019; Strotmeier et al., 2012). Il est ainsi primordial de prendre en compte l'espèce et la sous-population neuronale lors de l'utilisation de neurones primaires, mais surtout il est nécessaire de pouvoir développer des tests sur des cellules humaines non immortalisées ou primaires de sorte à s'affranchir de l'hétérogénéité et des limites caractéristiques des types cellulaires immortalisés ou primaires.

3. Cellules souches neurales dérivées de cellules souches pluripotentes humaines

Les récents progrès sur les cellules souches ont alimenté de nouvelles attentes pour la recherche, notamment en ce qui concerne les avancées sur les cellules souches pluripotentes humaines. Les cellules souches pluripotentes (CSP) humaines sont caractérisées par deux propriétés uniques : une capacité à donner naissance à tous les types de cellules formant un organisme, et la propriété d'auto-renouvellement qui dès lors fait de ces outils une source illimitée de cellules pour les applications cliniques et la recherche fondamentale.

Il existe deux sources de CSP humaines, les cellules souches embryonnaires (CSE) et les cellules souches pluripotentes induites (CSPi), qui se sont révélées très prometteuses pour des applications en médecine régénératrice, en modélisation pathologique, en criblage à haut débit pour la découverte de médicaments et en biologie du développement humain (Liu et al., 2020). Les CSP humaines seront présentées et détaillées dans le chapitre 2 de l'introduction.

Des protocoles robustes et bien caractérisés permettent aujourd'hui de différencier les CSP humaines en différentes sous-populations neuronales fonctionnelles, et sont constamment en cours de développement. Les protocoles développés permettent une conversion efficace des CSP cellules neuronales homogènes tels que les neurones moteurs étant la cible préférentielle des toxines (Bianchi et al., 2018; Maury et al., 2015; Qu et al., 2014), mais aussi les neurones corticaux (Gribaudo et al., 2019; Nicoleau et al., 2011) ou sensoriels (Umehara et al., 2020; Xiong et al., 2020) pouvant également être affectés par les toxines. Un des avantages de ces protocoles est qu'ils sont compatibles avec des études fonctionnelles et ce, à moyen et haut débit. Dans ce contexte, les progrès de la différenciation des neurones en un réseau fonctionnel révolutionnent l'utilisation des modèles neuronaux pour la recherche sur les BoNT grâce à leur grande sensibilité, en particulier celle des neurones moteurs (Duchesne de Lamotte et al., 2021; Nicoleau et al., 2018a; Pellett et al., 2019; Whitmarsh et al., 2012). En effet, de précédentes recherches ont permis de hiérarchiser la sensibilité de populations différentes de neurones aux BoNT. Ces travaux ont entre autres révélé que les neurones moteurs possédaient la sensibilité la plus importante aux BoNT, devant les neurones GABAergiques, eux même devant les neurones glutamatergiques, et enfin devant les neurones périphériques (Duchesne de Lamotte et al., 2021).

Les CSP humaines, et notamment les CSPi humaines, sont aujourd'hui la meilleure alternative aux modèles animaux couramment utilisés pour l'étude des BoNT qui présentent certaines limitations. Cependant, les modèles *in vitro* ne pourront pas substituer entièrement les modèles animaux car certains aspects dont l'évaluation des effets indésirables d'une molécule ou le devenir de cette molécule dans un organisme entier, ne peuvent être étudiés *in vitro*. Le développement de nouveaux modèles basés sur l'utilisation des CSP humaines permettrait toutefois de diminuer le nombre d'animaux. Par ailleurs, les progrès constants réalisés sur les CSPi particulièrement au niveau des protocoles de différenciation, permet la génération de modèles cellulaires physiologiques humains, fonctionnels et attrayants avec une véritable valeur translationnelle pour la recherche et le développement de thérapeutiques à base de BoNT. Cependant, les essais cellulaires ne peuvent déterminer les propriétés pharmacocinétiques telles que la distribution, la clairance, la diffusion, le transport et d'autres paramètres, que seuls les modèles *in vivo* peuvent évaluer (Pellett, 2013). L'ensemble des essais qu'ils soient *in vivo* ou *in vitro* sont donc complémentaires pour l'étude des toxines.

Chapitre 2 : Cellules souches et pluripotence

Découvertes il y a une trentaine d'années, les cellules souches capables d'auto-renouvellement et de différenciation au sein des tératocarcinomes, les cellules embryonnaires, sont à l'origine d'une révolution biologique et médicale porteuse de promesses thérapeutiques qui auraient été à peine imaginables il y a encore quelques années. C'est en 1998 que l'équipe américaine d'Alexander Thomson décrit pour la première fois la possibilité de maintenir *in vitro* les premières cellules souches embryonnaires humaines. Une vingtaine d'année plus tard, une équipe japonaise, dirigée par Shinya Yamanaka parvient à convertir, par modification génétique, des cellules somatiques adultes en cellules souches dites induites à la pluripotence.

Depuis leur première description, la communauté scientifique s'est enthousiasmée autour du potentiel extraordinaire de différenciation de ces cellules souches pluripotentes. Elles constituent pour la recherche en santé humaine un outil innovant, aussi bien dans la génération de modèles d'étude de mécanismes pathologiques que dans le développement et la découverte de nouveaux traitements, et enfin dans les perspectives d'applications en médecine régénératrice. Ces cellules offrent également la possibilité d'avoir accès à des types cellulaires difficiles voire impossibles d'obtenir à partir de patients tels que les neurones moteurs. Ces cellules souches humaines induites à la pluripotence évitent également les questions éthiques liés à l'utilisation des cellules embryonnaires.

Depuis 2007, les techniques de reprogrammation n'ont cessé de se perfectionner, et le développement de lignées cellulaires sûres et efficaces est devenu primordial. Aujourd'hui, la découverte des cellules souches pluripotentes humaines a révolutionné la recherche biomédicale. Il est donc important d'en comprendre l'émergence, les applications médicales, mais aussi les limitations, pour en apprécier l'intérêt et le potentiel pour l'étude des neurotoxines botuliques qui fait face à un manque évident de modèles d'étude humains pertinents pour le screening de nouvelles thérapeutiques.

I. Cellules souches : sésame de la recherche

Le terme de « cellule souche » désigne une grande variété de cellules aux potentiels divers.

A. Cellules souches : définitions

Les cellules souches se définissent par deux propriétés cardinales à savoir qu'elles sont capables à la fois de s'auto-renouveler et de donner naissance à des cellules spécialisées. Cependant, il existe différents types de cellules souches qui présentent des différences pour ces propriétés. Il est admis qu'il existe quatre catégories de cellules souches que l'on distingue essentiellement en fonction de leur capacité de différenciation (Figure 10).

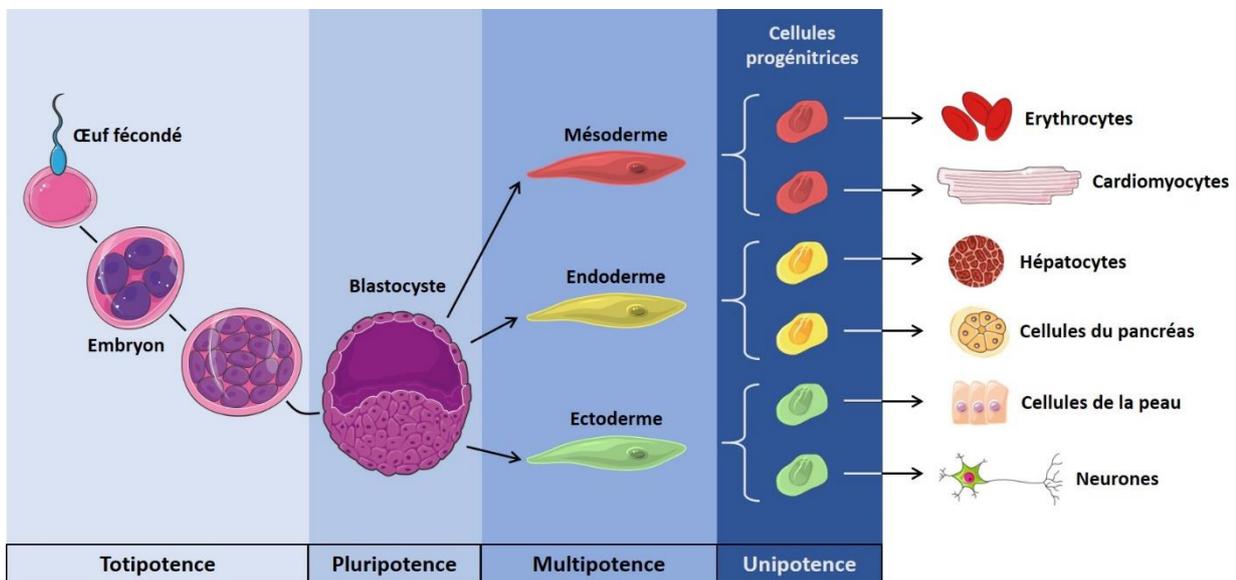


Figure 10. Différents niveaux de différenciation des cellules souches

Les cellules souches totipotentes sont les cellules issues des premières divisions de l'œuf fécondé, capables de donner naissance à tous les types de cellules de l'organisme. A partir du stade blastocyste, les cellules deviennent pluripotentes, et ne peuvent donner naissance qu'au trois lignées germinales. Ensuite, les cellules se spécialisent spécifiquement dans l'une des trois voies germinales. Les cellules atteignent un niveau d'unipotence et perdent leur capacité à se diviser. Les cellules souches ne sont plus considérées comme telles et deviennent des cellules somatiques de l'organisme. (Figure réalisée avec la banque d'images Servier)

Les cellules souches totipotentes, qui correspondent aux cellules de l'embryon, du stade zygote au stade huit cellules, ont la capacité de se différencier en tous les types cellulaires, embryonnaires (trois feuillets : mésoderme, endoderme, ectoderme) et extra-embryonnaires (placenta et cordon ombilical), et peuvent donner à elles seules un organisme vivant en entier.

Les cellules souches pluripotentes correspondent aux cellules souches de la masse interne de l'embryon au stade blastocyste, structure embryonnaire apparaissant chez l'Homme entre le 5^{ème} et le 7^{ème} jour après fécondation. Le blastocyste est constitué d'un amas interne de cellules appelée masse cellulaire interne (MCI) et d'une couche externe de cellules appelée trophoctoderme. Le trophoctoderme forme le tissu extra-embryonnaire qui donne naissance au placenta, au chorion et au cordon ombilical. La MCI se développe pour devenir l'embryon (Wobus and Boheler, 2005). Les cellules souches embryonnaires sont dites pluripotentes puisqu'elles peuvent générer les cellules des trois lignées germinales (mésoderme, endoderme, ectoderme), mais ne peuvent plus générer les cellules du trophoctoderme à l'origine des cellules des annexes embryonnaires.

Les cellules souches multipotentes sont présentes à un stade de développement plus avancé. Elles peuvent donner naissance à un nombre restreint de types cellulaires, et sont présentes aussi bien chez le fœtus que chez l'adulte.

Quant aux cellules souches unipotentes, elles peuvent se différencier en un seul type cellulaire généralement du même lignage dont elles sont issues.

B. Différents types de cellules souches

Dans la suite de ce chapitre, nous nous concentrerons uniquement sur les cellules souches pluripotentes : les cellules souches embryonnaires et les cellules souches pluripotentes induites.

1. Cellules souches embryonnaires

La dérivation des cellules souches embryonnaires (CSE) murines a été décrite pour la première fois au début des années 1980 (Condamine, 1980; Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Dans ces études, les chercheurs ont réussi à établir des lignées CSE murines isolées directement à partir de cellules de la MCI de blastocystes murins. Ce n'est qu'en 1998 que ces résultats ont pu être étendus aux CSE humaines isolées à partir d'embryons produits par fécondation *in vitro* (FIV) (Thomson, 1998).

Alors que la culture *in vitro* des CSE murines repose sur l'utilisation d'une cytokine exogène, le facteur LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*), essentielle pour le maintien de la pluripotence (Ohtsuka et al., 2015), des premiers travaux ont montré que l'activation de la voie activine/nodale et le facteur FGF (*Fibroblast Growth Factor*) était nécessaire pour maintenir l'état pluripotent des CSE humaines (Vallier, 2005). Depuis les deux dernières décennies, les méthodes de dérivation et de culture des CSE

humaines ont énormément évoluées, avec notamment le développement de milieux et de matrices permettant à la fois l'optimisation de la qualité des blastocystes avant dérivation d'une lignée de CSE humaines et une meilleure maîtrise des cultures de ces dernières (Ilic and Ogilvie, 2017; Kawamura et al., 2012; Tannenbaum et al., 2012; Zhang et al., 2012).

La génération des CSE humaines à partir de la MCI au stade de blastocyste a jusqu'à présent nécessité la destruction de l'embryon, suite à une FIV ou une FIV et un diagnostic préimplantatoire (DPI, dépistage de mutations génétiques chez les embryons), soulevant de nombreuses préoccupations éthiques, et présentant une grande hétérogénéité dans la différenciation cellulaire. Afin de résoudre ce problème, des travaux se sont consacrés à l'isolement de cellules à des stades antérieurs du développement embryonnaire sans destruction de l'embryon. Les premières tentatives de prélèvement d'une cellule au stade morula (huit cellules) ont donné des taux de réussite variables (Klimanskaya et al., 2007; Strelchenko et al., 2004). En effet, les cellules prélevées étaient mises en culture jusqu'à former des agrégats multicellulaires, puisensemencées avec des cellules nourricières et des CSE humaines déjà établies. Cependant, la différenciation s'est avérée inefficace car les agrégats donnaient principalement naissance à des cellules de type trophodermes.

Grâce à leurs propriétés uniques, les CSE humaines ont offert et continuent d'offrir de nouvelles opportunités de recherche en particulier dans le cadre de la médecine régénératrice. On dénombre aujourd'hui plus d'une trentaine d'essais cliniques réalisés ou en cours de développement qui se basent sur l'utilisation de dérivés issus de CSE humaines (Jarrige et al., 2021). Malgré leur potentiel thérapeutique indiscutable, la législation en France concernant la possibilité d'utiliser les CSE humaines a toujours été très encadrée et évolutive en fonction des développements scientifiques (Haoulia, 2014; Mahalatchimy and Rial-Sebbag, 2017). Initialement interdite dans les premières lois de Bioéthique de 1994, la recherche sur l'embryon et les CSE humaines a connu une évolution législative lente mais régulière. Elle est passée en 2004 à un régime d'interdiction avec dérogations pour évoluer à un régime d'autorisation encadré en 2013. Aujourd'hui, les chercheurs autorisés peuvent utiliser des CSE humaines issues d'embryons conçus *in vitro* dans le cadre d'une procréation médicalement assistée après consentement parental. Toutes les autorisations de recherche sont accordées par l'Agence de la biomédecine, structure étatique créée en 2005. Pour s'affranchir des difficultés associées à ces questions éthiques, de nombreux groupes se sont intéressés à disséquer les mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle de la pluripotence avec comme objectif d'identifier la possibilité de reproduire cet état *in vitro*.

2. Cellules souches pluripotentes induites

En 2006 la publication de K. Takahashi et S. Yamanaka, des chercheurs de l'université de Kyoto, a constitué une révolution dans le domaine des cellules souches pluripotentes. En effet, ils y présentaient une technique permettant de convertir des fibroblastes de souris adultes en cellules présentant les propriétés cardinales de cellules souches embryonnaires (Takahashi and Yamanaka, 2006). Cette technique appelée « reprogrammation » a été obtenue par l'introduction, via des rétrovirus, de quatre gènes codant des facteurs de transcription et sélectionnés parmi vingt-quatre gènes précédemment décrits pour leur contribution dans le maintien de l'état de pluripotence des cellules souches embryonnaires. Ces quatre facteurs de transcription OCT3/4 (*Octamer-binding Transcription factor 3/4*), SOX2 (*SRY-box transcription factor 2*), c-MYC (*Myc proto-oncogene protein*) et KLF4 (*Kruppel-like factor 4*) ont été identifiés comme étant les supports de cette reprogrammation.

En 2007, ces résultats ont pu être étendus aux cellules humaines. Deux équipes ont ainsi rapporté l'obtention de CSPi à partir de cellules somatiques humaines (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007) (Figure 11). Ces CSPi ont été générées en reprogrammant des fibroblastes humains, soit en utilisant des vecteurs rétroviraux permettant l'expression des gènes OCT3/4, SOX2, c-MYC et KLF4, soit grâce à des vecteurs lentiviraux codant pour OCT3/4, SOX2, NANOG et LIN28 (Tableau IV). Le rôle de chacun de ces facteurs de reprogrammation sera détaillé dans une prochaine partie.

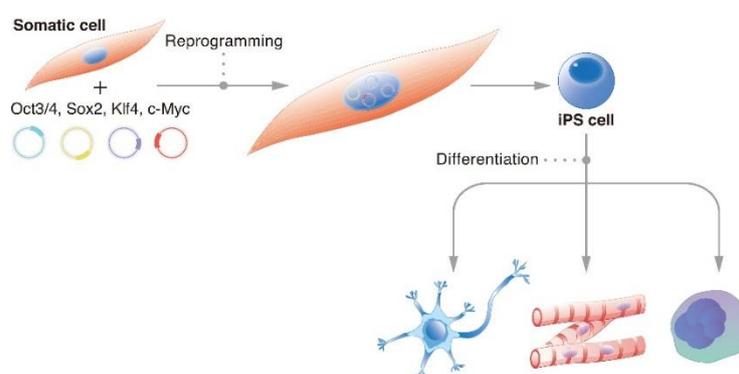


Figure 11. Génération des cellules souches pluripotentes induites humaines (Karagiannis et al., 2018)

Une cellule somatique est reprogrammée par induction d'un processus de reprogrammation par des facteurs exogènes spécifiques. Ce processus donne naissance à une CSPi humaine qui, dans des conditions de culture appropriées, est amenée à se différencier en n'importe quel type de cellules de l'organisme.

Etant donné le potentiel représenté par les CSP tant pour la recherche visant à comprendre les mécanismes des maladies et à les cibler, que pour leur utilisation dans des thérapies cellulaires, S. Yamanaka et J. Gurdon se sont vu attribuer le prix Nobel de physiologie et de médecine en 2012, pour leurs travaux sur la pluripotence et sur la reprogrammation.

Depuis ces premières études pionnières, de nombreux progrès ont été réalisés afin d'améliorer l'efficacité de la reprogrammation des cellules et de réduire les risques associés à l'utilisation de vecteurs intégratifs tels que les rétrovirus ou lentivirus. L'utilisation de transgènes, le remplacement des facteurs de reprogrammation par des composés chimiques, l'utilisation de certaines petites molécules améliorant la reprogrammation, le choix de la cellule somatique source, et les conditions de culture sont également des paramètres qui ont énormément évolué ces dernières années (Huangfu et al., 2008; Omole and Fakoya, 2018; Shi et al., 2008; Stadtfeld et al., 2008).

Tableau IV : Facteurs de reprogrammation des cellules humaines

Facteur de reprogrammation	Fonction	Effet sur la pluripotence	Utilisateur
OCT3/4	Maintien de la pluripotence Maintien de l'auto-renouvellement	+	S. Yamanaka J. Thomson
SOX2	Maintien de la pluripotence Maintien de l'auto-renouvellement	+	S. Yamanaka J. Thomson
c-MYC	Maintien de la pluripotence Maintien de l'auto-renouvellement	+	S. Yamanaka
KLF4	Maintien de la pluripotence Maintien de l'auto-renouvellement	+	S. Yamanaka
LIN28	Maintien de la pluripotence Amélioration de la traduction	+	J. Thomson
NANOG	Maintien de la pluripotence Maintien de l'auto-renouvellement	+	J. Thomson

c-MYC : myc proto-oncogene protein ; KLF4 : kruppel-like factor 4 ; OCT3/4 : octamer-binding transcription factor 3/4 ; SOX2: SRY-box transcription factor 2

II. Cellules souches pluripotentes

A. Induction de la pluripotence

L'identification des CSPi découle de travaux antérieurs visant à comprendre la pluripotence. Ces travaux ont mis en évidence la nécessité d'une meilleure compréhension mécanistique du processus de reprogrammation afin d'en améliorer l'efficacité. Il est ainsi nécessaire de comprendre

quels sont les régulateurs nécessaires pour induire et maintenir la pluripotence de manière fiable et efficace. Pour atteindre cet objectif, trois méthodes de reprogrammation ont été employées avec une volonté de réinitialiser l'état transcriptionnel de la cellule différenciée et le convertir en un état embryonnaire : la fusion cellulaire, le transfert nucléaire et la reprogrammation induite (Figure 12).

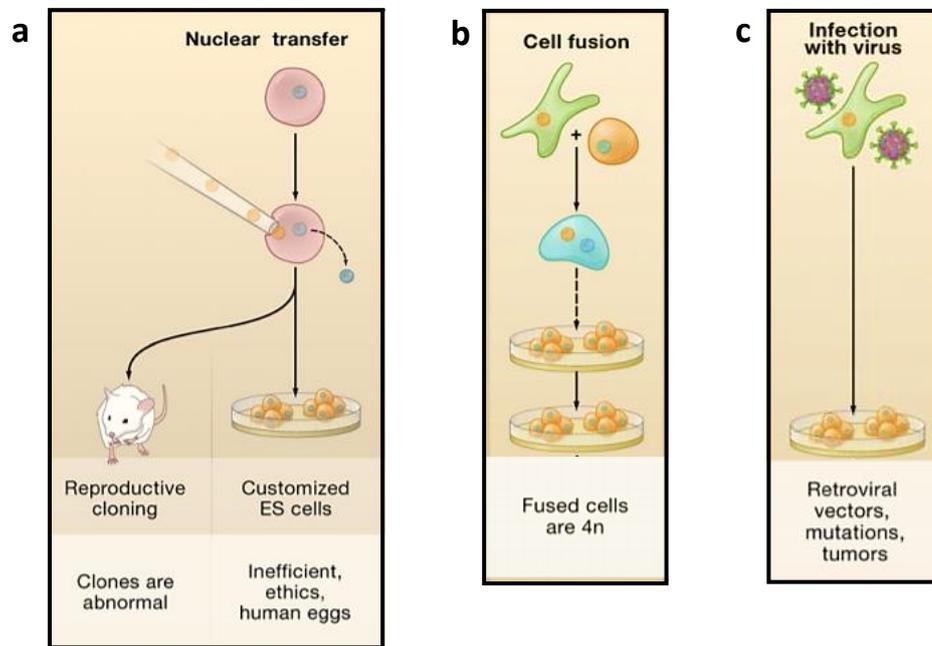


Figure 12. Méthodes de reprogrammation des cellules somatiques (Jaenisch and Young, 2008)

(a) Le transfert nucléaire implique l'injection d'un noyau d'une cellule somatique dans un ovocyte énucléé. L'ovocyte entraîne la reprogrammation du noyau et donne naissance à un blastocyste et génère des CSE portant le matériel génétique de la cellule somatique donneuse. En laissant l'embryon se développer à son terme, il s'agit de clonage reproductif, totalement interdit chez l'Homme. (b) La fusion cellulaire de cellules somatiques avec des CSE entraîne la génération d'hybrides qui présentent toutes les caractéristiques des CSP. (c) La reprogrammation induite consiste à introduire des gènes spécifiques dans les cellules somatiques pour induire ces cellules à la pluripotence et générer des CSPi, ayant des caractéristiques semblables aux CSE.

1. Transfert nucléaire somatique

Le processus de transfert nucléaire des cellules somatique, également nommé « clonage », consiste à extraire le noyau d'une cellule somatique pour ensuite l'insérer dans une cellule œuf dépourvue de noyau. Mise au point par King et Briggs en 1952, cette technique consista à implanter des noyaux issus de blastocystes de têtards dans des oocytes (œufs non fertilisés) énucléés (Briggs and King, 1952). Ils démontrèrent ainsi le potentiel développemental du noyau d'une cellule. Dix ans plus tard, Gurdon parvint à cloner le tout premier animal en transplantant le noyau de cellules intestinales de xénope dans une cellule œuf énucléée de la même espèce (Gurdon, 1962). Cependant,

l'efficacité de ces expériences était très faible. Ces expériences ont mis en évidence que les cellules différenciées conservaient dans leur ADN la capacité à former un embryon, évoquant la possibilité que l'information génétique des cellules souches embryonnaires n'était pas modifiée au cours du développement et que les cellules somatiques pouvaient revenir à un état pluripotent.

Ce n'est que trente ans plus tard que Wilmut réussit avec succès le transfert nucléaire chez le mammifère pour donner naissance à la brebis Dolly (Wilmut et al., 1997). Cette nouvelle découverte a stimulé l'adaptation de la technique de transfert nucléaire dans de nombreuses espèces de mammifères notamment la souris et les primates non humains (Kishigami and Wakayama, 2009; Liu et al., 2018; Mitalipov and Wolf, 2006).

Malgré ces avancées, l'efficacité de reprogrammation reste très faible (3 à 5% uniquement) notamment pour certaines espèces dont la souris, le rat et le primate (Fulka and Fulka, 2007; Wilmut et al., 2015), et d'importantes anomalies ont été observées chez les animaux clonés : expression de gènes aberrants dans l'embryon obtenu, élongation des télomères, obésité chez l'adulte, système immunitaire déficient, susceptibilité aux cancers augmentée et une mort prématurée. Afin de pallier à certaines de ces anomalies, diverses méthodes ont été testées (molécules chimiques, inhibition de cytokines, fusion des cellules, etc.) mais aucune n'a permis d'augmenter l'efficacité du transfert nucléaire (Matoba and Zhang, 2018; Thuan et al., 2010; Whitworth and Prather, 2010).

2. Fusion des cellules somatiques et des cellules souches embryonnaires

Fusionner deux types cellulaires, dont l'un doit déjà être pluripotent, pour obtenir une seule entité permet de reprogrammer facilement des cellules à un état pluripotent. Les premières expériences de fusion cellulaire mirent en jeu des cellules somatiques d'abord fusionnées avec des cellules embryonnaires de tératocarcinome (Miller and Ruddle, 1976), puis avec des CSE murines (Tada et al., 2001), et enfin avec des CSE humaines (Cowan, 2005). La fusion des cellules somatiques avec les CSE conduit à la formation de cellules phénotypiquement proches des cellules embryonnaires (Matveeva et al., 1998; Tada et al., 2001). La pluripotence des cellules hybrides générées a été démontrée *in vivo*, puisqu'elles ont contribué aux trois couches germinales primaires des embryons chimériques (Tada et al., 2001). Toutefois, cette méthode de fusion cellulaire n'a aucune application thérapeutique puisque les cellules hybrides obtenues sont tétraploïdes. Mais ces expériences ont mis en évidence qu'une cellule pluripotente pouvait convertir une cellule somatique.

3. Reprogrammation induite

Le succès de la reprogrammation des cellules somatiques par fusion avec les CSE a mis en évidence que les CSE possédaient des facteurs induisant la pluripotence. Ces facteurs pourraient également jouer un rôle essentiel dans le maintien de la pluripotence. C'est pourquoi sur la base de cette hypothèse, vingt-quatre facteurs candidats ont été testés pour leur capacité à induire la pluripotence. Ces facteurs candidats ont d'abord été testés individuellement, puis de façon combinée, pour déterminer précisément lesquels étaient nécessaires à l'induction de la pluripotence. L'introduction de quatre facteurs de transcription (OCT3/4, SOX2, c-MYC et KLF4) par rétrovirus dans les fibroblastes embryonnaires ou adultes de souris, a permis de générer des CSPi avec une morphologie similaire à celle des CSE (Takahashi and Yamanaka, 2006). Les cellules reprogrammées sont aussi à l'origine de la formation de tératomes lorsqu'elles sont injectées dans des souris immunodéficientes et peuvent se différencier dans les trois lignées germinales (endoderme, mésoderme, ectoderme) (Nelakanti et al., 2015; Takahashi and Yamanaka, 2006). Dans un second temps, une nouvelle combinaison de facteurs de transcription (OCT3/4, SOX2, LIN28 et NANOG) a été utilisée pour reprogrammer les cellules somatiques humaines en CSP qui présentent les caractéristiques essentielles des CSE (Yu et al., 2007).

La génération des CSPi après utilisation de différentes combinaisons de facteurs de transcription a suggéré que plusieurs facteurs de transcription pouvaient activer la même reprogrammation en renforçant la synthèse des uns et des autres. Les reprogrammations liées à ces combinaisons se sont avérées efficaces sur un large éventail de systèmes de distribution, bien qu'à des degrés variables (González et al., 2011). Par conséquent, de nouvelles molécules ont été découvertes avec un véritable potentiel pour améliorer la technique de reprogrammation et son efficacité, dont des molécules impliquées dans l'apoptose et le cycle cellulaire, ou dans le remodelage de la chromatine (Omole and Fakoya, 2018).

B. Cellules souches pluripotentes induites

L'efficacité, la reproductibilité et la qualité des CSPi générées sont dépendantes de plusieurs paramètres : le choix de la cellule souche à reprogrammer, des facteurs de reprogrammation, la méthode de vectorisation, et les conditions de culture.

1. Choix des cellules à reprogrammer

Les premières cellules reprogrammées par S. Yamanaka étaient des fibroblastes murins, puis humains. Les fibroblastes ont certains avantages sur les autres types cellulaires, entre autres ils sont obtenus assez facilement par simple biopsie de peau, ils sont relativement faciles à amplifier en culture, et ils possèdent une bonne prédisposition à se reprogrammer. Depuis, d'autres types cellulaires, murins ou humains, ont été reprogrammés en CSPi avec succès (Aasen et al., 2008; Aoi et al., 2008; Eminli et al., 2008; Loh et al., 2009; Silva et al., 2008; Sun et al., 2009).

Cependant, l'efficacité de la reprogrammation semble en partie déterminée par le choix des cellules sources. Par exemple, les kératinocytes humains sont plus rapidement et efficacement reprogrammés que les fibroblastes humains (Aasen et al., 2008). Par ailleurs, la performance de la reprogrammation varie en fonction du stade de différenciation de la cellule source. Par exemple, les progéniteurs hématopoïétiques sont plus faciles à reprogrammer que les lymphocytes B ou T (Eminli et al., 2009). L'augmentation de l'efficacité de reprogrammation et/ou la diminution du nombre de facteurs requis peut être due à l'expression élevée de certains facteurs de reprogrammation et/ou aux statuts épigénétiques intrinsèques qui les rendent plus facilement reprogrammable (González et al., 2011). Il faut également prendre en compte l'âge des cellules (âge de la cellule source et âge de la culture) qui apparaît quelques fois comme un obstacle à la dérivation car les cellules âgées peuvent comporter des mutations génétiques qui se retrouveraient dans les cellules reprogrammées. Cependant, grâce à un protocole optimisé, des chercheurs ont démontré que le vieillissement cellulaire n'était pas une limite à la reprogrammation et que la physiologie cellulaire liée à l'âge était réversible (Lapasset et al., 2011). De plus, le statut épigénétique propre à la cellule peut influencer la reprogrammation. Les CSPi conservent une signature épigénétique caractéristique de la cellule dont elles sont issues (Kim et al., 2010; Vaskova et al., 2013).

2. Choix des facteurs de reprogrammation

Différents cocktails de facteurs de reprogrammation ont été mis au point afin de générer des CSPi. Parmi les facteurs de reprogrammation les plus connus figurent :

- OCT3/OCT4 (*POU5F1*, *POU class 5 Homeobox 1*), une protéine intervenant dans le passage du stade morula au stade blastocyste (Nichols et al., 1998). Elle induit également l'activation du réseau de pluripotence et la capacité d'auto-renouvellement.

- SOX2, qui joue un rôle essentiel dans la pluripotence et l'auto-renouvellement des cellules embryonnaires (Avilion, 2003).
- c-MYC, un oncogène qui s'exprime dans les cellules à forte activité proliférative (Araki et al., 2011). Il induit également l'auto-renouvellement.
- KLF4, qui agit sur la transcription en l'activant ou en la réprimant (Li et al., 2005).
- NANOG, qui joue un rôle dans le maintien de la pluripotence et de l'auto-renouvellement des cellules embryonnaires (Cavaleri and Schöler, 2003).
- LIN28, une protéine exprimée au début de l'embryogenèse intervenant dans le processus de dédifférenciation et qui stimule la division et la différenciation cellulaire (Darr and Benvenisty, 2009).

Il est important de considérer une balance entre ces facteurs pour que la reprogrammation soit efficace, notamment entre c-MYC et KLF4 (KLF4 pourrait réprimer l'activité de c-MYC). Par ailleurs, l'utilisation de ces deux facteurs entraîne dans certains cas la formation de tumeurs attribuable à la réactivation de l'expression rétrovirale de c-MYC entre autre (Liao et al., 2018; Okita et al., 2007).

D'autres facteurs de transcription se sont révélés être intéressants pour la reprogrammation tels que UTF1 (*Undifferentiated Embryonic Cell Transcription Factor 1*) et SALL4 (*Spalt like transcription factor 4*) (Buganim et al., 2012; Tsubooka et al., 2009; Zhao et al., 2008). Certaines équipes de recherche ont également montré l'efficacité de l'utilisation de seulement deux facteurs, OCT3/4 et SOX2, sous certaines conditions dont la modulation des mécanismes épigénétiques impliqués dans le remodelage de la chromatine par le biais de molécules telles que l'acide valproïque ou le butyrate de sodium, deux inhibiteurs d'histone déacétylases connus pour améliorer l'induction de la pluripotence (Huangfu et al., 2008; Mali et al., 2010; Zhai et al., 2015). Enfin, agir sur certaines voies de signalisation peut aussi augmenter l'efficacité de la reprogrammation, par exemple en jouant sur la signalisation TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) ou bien la signalisation des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) (Neganova et al., 2017). Ces voies de signalisation sont impliquées dans la transition du stade de l'initiation de la reprogrammation à celui de la maturation, ce qui renforce la maturation et la survie des cellules reprogrammées.

Enfin, le niveau d'expression de chacun des facteurs de reprogrammation utilisés ainsi que la stœchiométrie entre ceux-ci, sont d'importants critères pour une bonne induction de la reprogrammation. En effet, il existe un circuit de régulation entre ces facteurs (Figure 13). Il a été

démontré que la proportion élevée du facteur OCT3/4 par rapport à l'expression des autres facteurs d'un même cocktail, augmente la reprogrammation des CSPI. A l'inverse, une expression trop élevée des facteurs SOX2, c-MYC et KLF4 peut diminuer l'efficacité de la reprogrammation (Wernig et al., 2007).

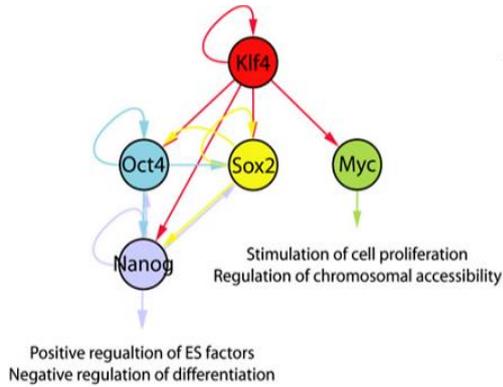


Figure 13. Circuit de régulation transcriptionnelle des facteurs de reprogrammation (Kim et al., 2008)

3. Méthodes de vectorisation

Différentes stratégies de vectorisation ont été développées afin de délivrer les facteurs de reprogrammation jusqu'aux cellules somatiques. Elles comportent des stratégies comportant des systèmes viraux (intégratifs ou non intégratifs) et des systèmes non viraux (Figure 14).

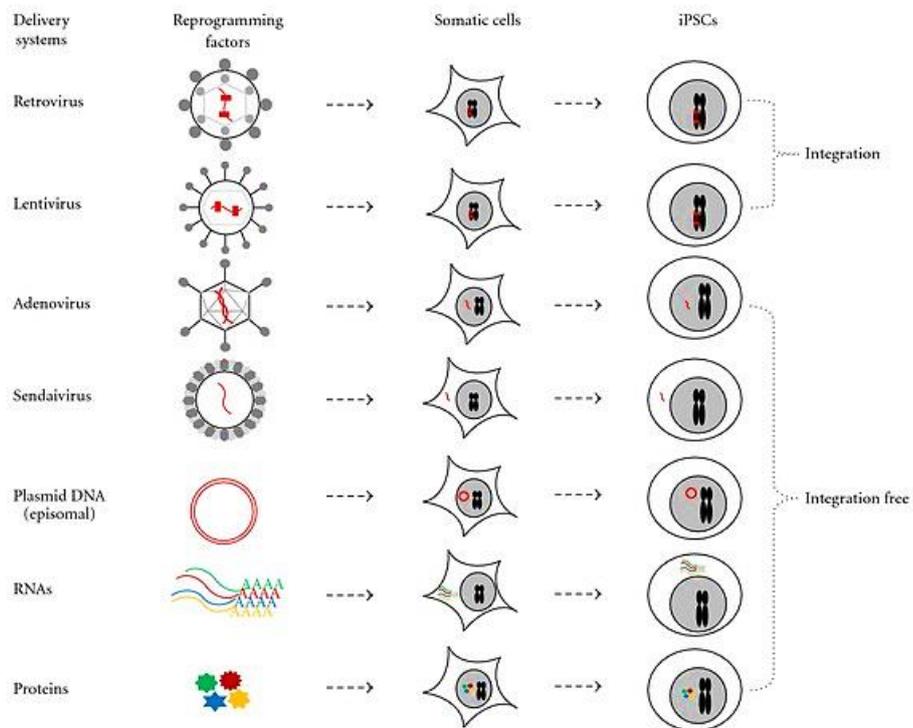


Figure 14. Stratégies de vectorisation pour la reprogrammation des cellules somatique (Oh et al., 2012)

Les premières générations de CSPi ont été obtenues grâce aux systèmes de vectorisation viraux intégratifs. Ces systèmes permettent de délivrer du matériel génétique à une cellule cible avec une bonne efficacité et d'induire l'expression à long terme du gène. Cependant, ces systèmes peuvent engendrer des multiples copies du gène qui s'intégreront dans le génome et causer la réactivation de facteurs silencieux tels que c-MYC et KLF4, voire de bloquer la différenciation vers certains types cellulaires. Parmi ces vecteurs on retrouve les rétrovirus et les lentivirus (Yu et al., 2007).

Des méthodes virales non intégratives ont ensuite été développées. Parmi ces vecteurs on retrouve les adénovirus, les plasmides et le virus Sendai (Fusaki et al., 2009; Stadtfeld et al., 2008). En raison de son efficacité de reprogrammation relativement élevée dans de multiples types de cellules somatiques, le virus Sendai est un choix pertinent pour la reprogrammation.

Enfin, parmi les méthodes non virales, figurent la reprogrammation par les ARNm synthétiques ainsi que la reprogrammation par les protéines recombinantes (Kogut et al., 2018; Zhou et al., 2009). Ces méthodes restent aujourd'hui peu utilisées du fait de leur faible taux d'efficacité.

La stratégie doit être adaptée à l'usage souhaité des CSPi reprogrammées, et les avantages et inconvénients de chaque stratégie doivent être considérés (Tableau V). De nombreuses avancées dans ces techniques de vectorisation ont été réalisées jusque-là, mais continuer à améliorer l'efficacité est primordial. Actuellement, c'est la méthode de reprogrammation du virus Sendai qui est la plus utilisée de par sa simplicité, son efficacité et son coût raisonnable.

Tableau V : Méthodes de vectorisation pour la reprogrammation (Antony-Debré et al., 2013)

Type de vecteur	INTÉGRATION				SANS INTÉGRATION					
	Vecteurs intégratifs		Vecteurs excisibles		Vecteurs non intégratifs			Méthodes sans vecteurs		
	Rétrovirus	Lentivirus	Lentivirus floxé	Transposon	Adénovirus	Plasmides	Virus Sendai	Protéines	ARNm	miRNA
Efficacité de reprogrammation	0,01-0,5%	0,1-1%	0,1-1%	0,1%	0,001%	0,001%	0,02-1%	0,001%	1%	0,01-0,5%
Avantages	Efficacité	Efficacité	Efficacité, pas d'intégration	Efficacité raisonnable, pas d'intégration	Pas d'intégration	Pas d'intégration	Efficacité, pas d'intégration	Pas d'intégration, pas d'ADN	Pas d'intégration, efficacité	Pas d'intégration, efficacité
Inconvénients	Intégrations multiples, réactivation des transgènes	Intégrations multiples, réactivation des transgènes	Obtention des lignées laborieuse	Obtention des lignées laborieuse	Faible efficacité	Faible efficacité, intégration occasionnelle	Efficacité moyenne sur les cellules matures	Faible efficacité	Plusieurs transfections nécessaires	Plusieurs transfections nécessaires

4. Caractéristiques moléculaires et contrôle qualité

Les CSPi sont caractérisées par l'expression d'un certain nombre de marqueurs associés à l'état pluripotent. A l'état indifférencié, les CSP expriment entre autres des marqueurs de surface spécifiques du stade embryonnaire SSEA3 et SSEA4 (*Stage Specific Embryonic Antigen 3/4*) ainsi que les marqueurs TRA-1-60 et TRA-1-81 (*Tumour Rejection Antigen*), et se caractérisent par l'expression des facteurs de transcription OCT4, SOX2 et NANOG (Sullivan et al., 2018; Zhao et al., 2012). Le contrôle qualité des cellules passe ainsi par la caractérisation de l'expression de ces marqueurs.

Au niveau génomique, il est important de vérifier la qualité de l'amplification des cellules qui peut entraîner l'apparition d'aberrations chromosomiques (gain ou perte partielle ou totale d'un chromosome) provoquées par un nombre d'amplifications trop important (Baker et al., 2007; Lefort et al., 2008; Maitra et al., 2005; Taapken et al., 2011). Par ailleurs, il est admis que les CSE humaines et les CSPi humaines sont autant instables en culture en terme d'intégrité chromosomique (Taapken et al., 2011). La vérification du caryotype et de l'intégrité génomique est donc primordiale pour caractériser les CSP humaines.

C. Différenciation des cellules souches pluripotentes induites en progéniteurs neuronaux

Dans le cadre du projet de thèse, nous avons différencié des CSPi humaines en progéniteurs neuronaux à partir de protocoles établis au laboratoire I-Stem (Gribaudo et al., 2019; Maury et al., 2015), afin de mettre au point les modèles synaptiques *in vitro* nécessaires pour notre étude. Dans cette partie, nous aborderons ainsi les caractéristiques de la différenciation des cellules souches neuronales pour comprendre comment nous sommes arrivés à générer nos modèles cellulaires pour étudier les toxines. Afin d'orienter les CSP vers un destin neuronal *in vitro*, il est important de comprendre dans un premier temps l'organisation cellulaire ainsi que les facteurs impliqués dans le développement du système nerveux embryonnaire (Purves and Williams, 2001).

La plaque neurale est une structure plane composée de cellules ectodermiques (neuroépithélium) qui fusionne dorsalement pour former un cylindre, le tube neural. Ce dernier contient des progéniteurs neuronaux multipotents qui génèrent à la fois les neurones et les cellules gliales du système nerveux central. Le système nerveux périphérique, lui, est dérivé de la crête neurale composée de cellules qui émergent du tube neural dorsal et migre en périphérie. Puis, trois vésicules

primaires se développent dans la partie rostrale du tube neural : le prosencéphale (cerveau antérieur), le mésencéphale (cerveau moyen) et le rhombencéphale (cerveau postérieur). Quant au tube neural caudal, il reste indifférencié et formera la moelle épinière mature. Enfin, des vésicules secondaires vont émerger du prosencéphale, pour donner naissance au télencéphale (hémisphères cérébraux) et au diencéphale (thalamus et hypothalamus) (Petros et al., 2011; Shimamura et al., 1995).

Parmi les voies de signalisation impliquées dans la spécification des destins neuronaux pendant la gastrulation, figurent les voies BMP et Wnt jouant un rôle dans la suppression de l'induction neurale de l'ectoderme et favorise la spécification mésodermique et/ou endodermique (Bone et al., 2011; Levine and Brivanlou, 2007; Muñoz-Sanjuán and Brivanlou, 2002). Au cours de la gastrulation, des facteurs sont sécrétés par un groupe de cellules pour inhiber l'effet du BMP et donc initier l'induction neurale. De ce fait, l'induction neurale nécessite principalement l'inhibition de destins non neuronaux en bloquant les inhibiteurs neuronaux (système de double inhibition). Au fil du développement du système nerveux central, des facteurs de signalisation sont exprimés sous forme de gradients le long de l'axe rostro-caudal (axe antéro-postérieur) et de l'axe dorsal-ventral (Figure 15). Ces facteurs permettent de régionaliser les cellules afin d'affiner leur destin neuronal. Il est important de noter que la même molécule de signalisation peut induire des effets différents en fonction de sa concentration. Par exemple, les facteurs BMP et Wnt sont exprimés dans toute la partie dorsale et sont nécessaires à la formation du tissu neural dorsal (Ille et al., 2007; Kirkeby et al., 2012; Shimogori, 2004). La ventralisation est principalement dirigée par le facteur Shh (*Sonic hedgehog*) qui est sécrété par la notochorde au niveau de la ligne médiane ventrale du tube neural (Dessaud et al., 2008; Ribes and Briscoe, 2009). L'acide rétinoïque (RA), molécule caudalisante, est présent à des niveaux élevés dans la colonne vertébrale primitive et, en combinaison avec le FGF il module les différents segments de la moelle épinière (Maden, 2006). La concentration du RA doit être adaptée car à de fortes doses l'embryon ne développera pas de cerveau (Durst et al., 1989; Sive et al., 1990).

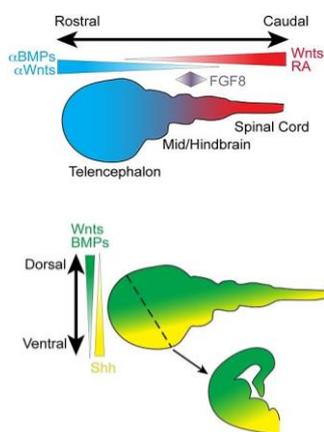


Figure 15. Régionalisation du cerveau embryonnaire (Petros et al., 2011)

Le développement du système nerveux central repose sur l'existence de gradients de facteurs se mettant en place sur les axes rostro-caudal et dorso-ventral au cours de l'embryogenèse, à l'origine de la régionalisation du tube neural. Ainsi, selon leur position au niveau des axes, les cellules expriment des profils d'expression géniques distincts qui participeront à leur engagement vers une identité cellulaire particulière.

Ainsi, la spécification d'un neurone dépend de sa position le long de l'axe, de son profil génétique et des facteurs exprimés tels que BMP, Wnt, Shh, FGF, RA, ou d'autres facteurs. Il est ainsi possible de générer une grande diversité de neurones comme des neurones excitateurs ou inhibiteurs, ou encore des neurones appartenant à des régions cérébrales distinctes tels que le cortex, le cervelet, le striatum, l'hypothalamus ou l'hippocampe (Aubry et al., 2008; Goulburn et al., 2011; Maury et al., 2015; Perrier et al., 2004; Sarkar et al., 2018; Wataya et al., 2008) (Figure 16).

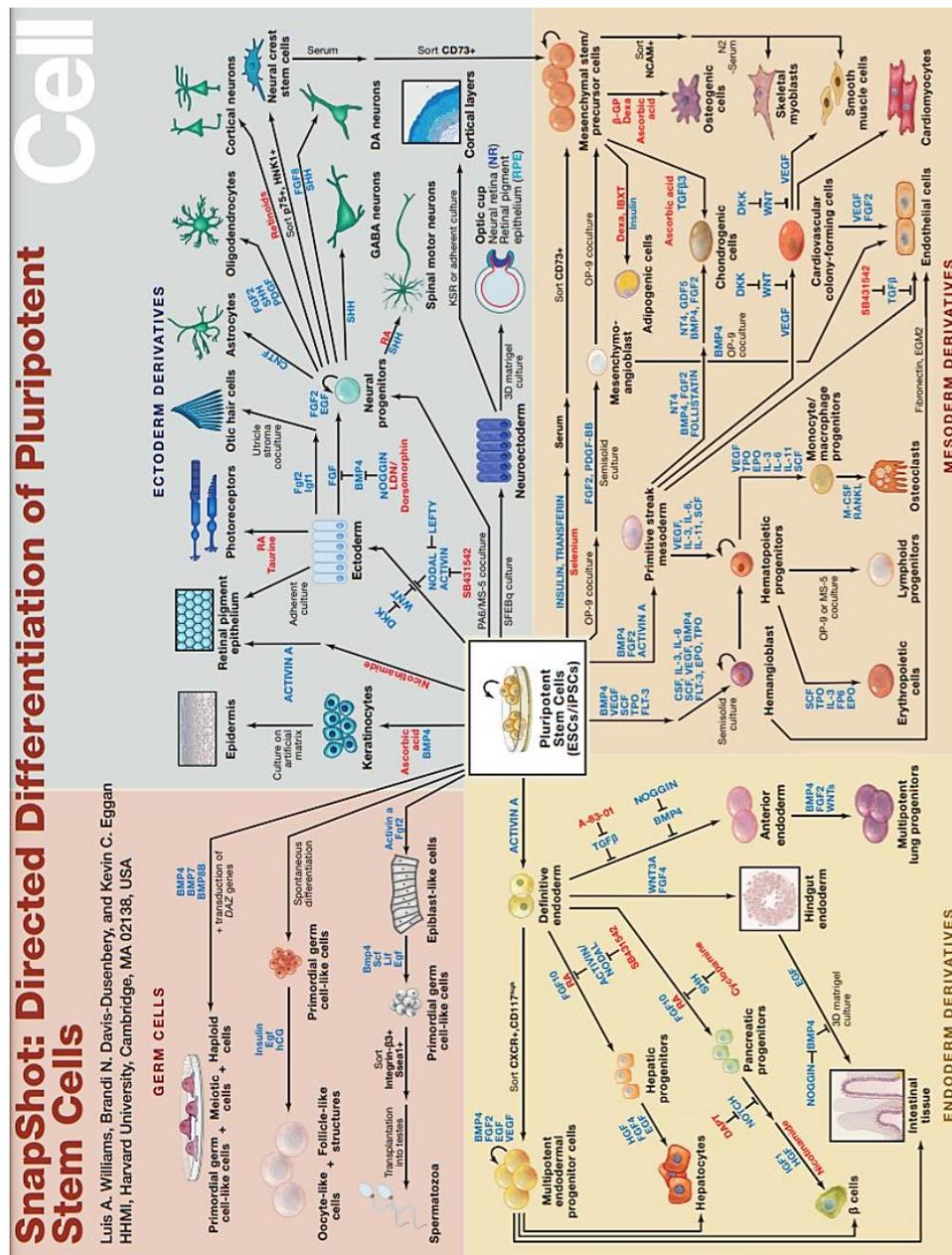


Figure 16. Différenciation des cellules souches pluripotentes (Williams et al., 2012)

Les CSP peuvent être différenciées en différents types cellulaires issus des feuillet embryonnaires (endoderme, mésoderme, ectoderme). Les dérivés neuronaux sont issus du feuillet ectodermique.

Il existe plusieurs méthodes d'induction neurale des CSPi. Les protocoles diffèrent non seulement par la durée et les conditions de culture, mais aussi par les caractéristiques des cellules progénitrices neurales générées. L'induction neurale peut s'effectuer de plusieurs façons : monoculture 2D (Fedorova et al., 2019), coculture 2D avec cellules stromales (Kawasaki et al., 2000; Perrier et al., 2004), rosettes neurales 2D (Chambers et al., 2009; Watanabe et al., 2007), culture 3D (Eiraku et al., 2008; Mariani et al., 2012), organoïdes (Anastasaki et al., 2020; Gabriel and Gopalakrishnan, 2017; Lancaster and Huch, 2019). Les différentes méthodes de l'induction neurale et des protocoles de générations des CSN sont schématisées dans la figure 17.

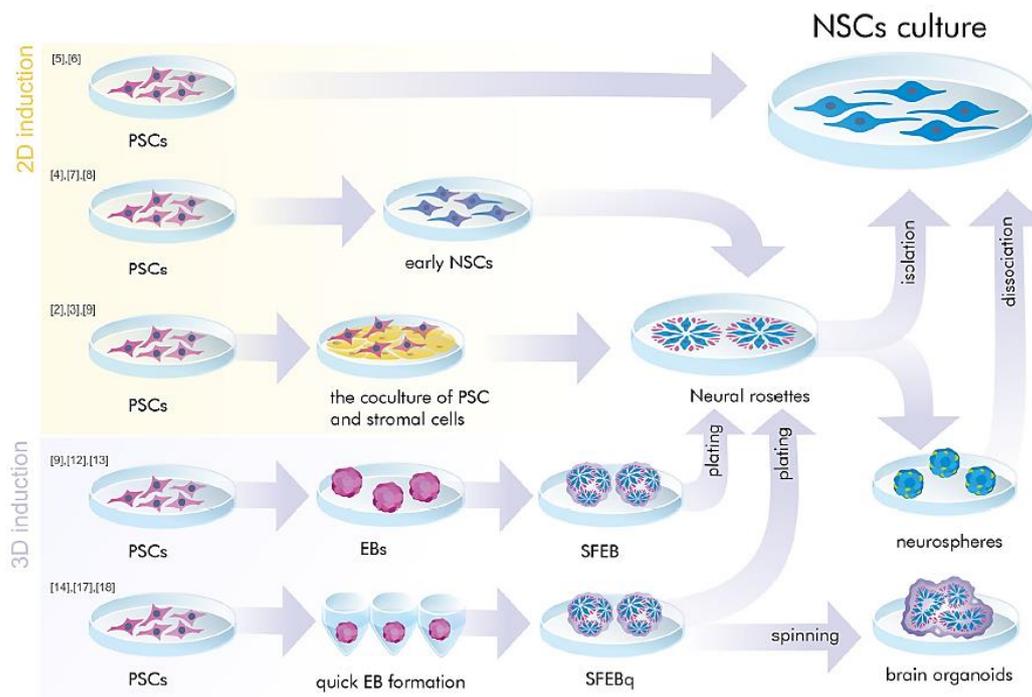


Figure 17. Principes de l'induction neurale (Galiakberova and Dashinimaev, 2020)

L'induction neurale peut être réalisée dans des conditions 2D (monocouche ou coculture) ou dans des conditions 3D (corps embryonnaires). Ensuite, la génération et/ou la culture des CSN peut se faire en monoculture ou coculture 2D, ou en culture 3D (neurosphères, organoïdes).

PSCs, pluripotent stem cells; NSCs, neural stem cells; SFEB(q), (quick) serum free culture of embryoid bodies.

Corps embryonnaires

Les corps embryonnaires (EB) sont des agrégats 3D formés en suspension à partir de CSP y compris les CSE et les CSPi. Les EB formés ont le potentiel de se différencier spontanément dans les différents lignages des trois feuilletts embryonnaires. Les EB sont ensuite entretenus en condition adhérente dans un milieu de culture supplémenté de facteurs comme le FGF, pour donner naissance aux rosettes neurales qui expriment des marqueurs du neuroectoderme tels que PAX6 (*Paired box*

protein) et SOX1 (*SRY-box transcription factor 1*), des marqueurs neuroépithéliaux comme les N-cadhérines, et des précurseurs neuronaux tels que la Nestine (Elkabetz et al., 2008). En fonction des morphogènes utilisés, les rosettes neurales seront capables de se différencier en précurseurs neuronaux plus engagés qui peuvent ensuite générer des types de neurones et des cellules gliales distincts (Elkabetz et al., 2008; Koch et al., 2009; Perrier et al., 2004). Une équipe a également démontré que les CSP humaines à partir d'EB pouvaient donner naissance à des précurseurs neuronaux après avoir été cultivées en suspension pendant quelques jours (Zhang et al., 2001). Les précurseurs neuronaux ont ensuite été isolés et se sont développés sous forme d'agrégats de cellules flottantes appelés neurosphères, en présence de FGF-2. Une fois les neurosphères cultivées en condition adhérente, trois types cellulaires du système nerveux central ont pu être générés (neurones, astrocytes et oligodendrocytes).

Monocouche

La culture de cellules en monocouche est une approche efficace pour l'induction neurale qui est basée sur l'inhibition simultanée de deux principales voies de signalisation : la voie de signalisation TGF- β /Activine/Nodale via l'exposition des cellules au composé SB-431542 (inhibiteur de TGF- β) et la voie de signalisation BMP (*Bone Morphogenetic Proteins*) via l'exposition des cellules à la protéine Noggin (antagoniste de BMP) (Benchoua et al., 2008; Chambers et al., 2009). Cette inhibition simultanée est communément appelée « Dual-SMAD inhibition » (Figure 18), et permet de générer des cellules progénitrices neurales exprimant PAX6 après quelques jours d'exposition avec une efficacité de 80% (Kallur et al., 2008). Noggin a été utilisé dans l'induction neurale (Lee et al., 2007), tandis que SB-431542 a été utilisé pour sortir de l'état de pluripotence et donc renforcer la différenciation neurale pendant la formation des EB (Smith et al., 2008; Vallier, 2005). La combinaison de ces deux facteurs inhibiteurs de la signalisation SMAD élimine la nécessité d'un processus intermédiaire comme la formation des EB, ce simplifie particulièrement le protocole d'induction neurale. Par ailleurs, il a été démontré que l'ajout d'acide rétinoïque au protocole de la double inhibition des SMAD améliore considérablement l'efficacité de la différenciation des CSE humaines et CSPi humaines en CSN (Shi et al., 2012a).

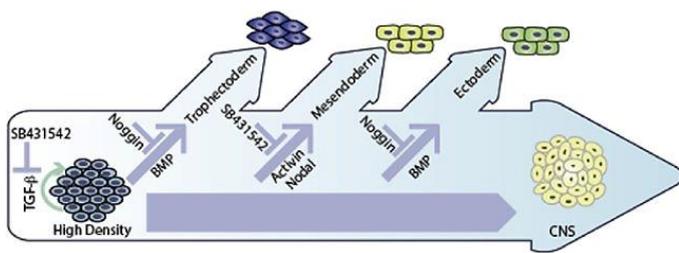


Figure 18. Dual SMAD inhibition (Borooah et al., 2013)

La double inhibition des SMAD avec le SB-431542 et la Noggin module les interactions des voies TGF- β et BMP afin de stimuler la différenciation des CSP en CSN.

Coculture

Une dernière méthode a été développée se basant sur l'ensemencement des CSP sur des cellules stromales ce qui induit leur différenciation neurale. Les lignées cellulaires stromales MS5 et PA6 sont isolées de la moelle osseuse et utilisées comme couche de cellules nourricières jouant un rôle dans la croissance des cellules souches (Itoh et al., 1989). La lignée PA6 est également connue pour sécréter des facteurs impliqués dans la modulation de l'induction neurale, et pour favoriser la différenciation en neurones dopaminergiques (Kawasaki et al., 2000; Perrier et al., 2004). Les cellules stromales issues de la lignée PA6 expriment des facteurs associés au développement du système nerveux central : SDF-1 (*Stromal cell-derived Factor 1*), PTN (*Pleiotrophin*), IGF2 (*Insulin-like Growth Factor 2*) et EFNB1 (*Ephrin B1*). Des études ont montré que lorsque ces quatre facteurs étaient appliqués aux CSE humaines, ils induisaient la différenciation de neurones dopaminergiques (Vazin et al., 2009). D'autres facteurs tels que sFRP1 (*secreted Frizzled-Related Protein 1*) et VEGFD (*Vascular Endothelial Growth Factor D*) ont également montré leur importance à induire une identité neurale (Schwartz et al., 2012). Quant aux cellules stromales issues de la lignée MS5, elles favorisent la différenciation en neurones glutamatergiques ou dopaminergiques selon les conditions et facteurs utilisés (Ideguchi et al., 2010; Lim et al., 2015).

III. Cellules souches pluripotentes induites : outil précieux pour la médecine

Les CSE humaines et les CSPi humaines ont, depuis leur première description, suscité un vif intérêt pour la recherche biomédicale. En particulier, les CSPi humaines offrent de par leur absence de problème éthique, un potentiel pour modéliser de nombreuses pathologies, tester la toxicité et l'activité de nouvelles molécules, et être utilisées en thérapie cellulaire (Figure 19).

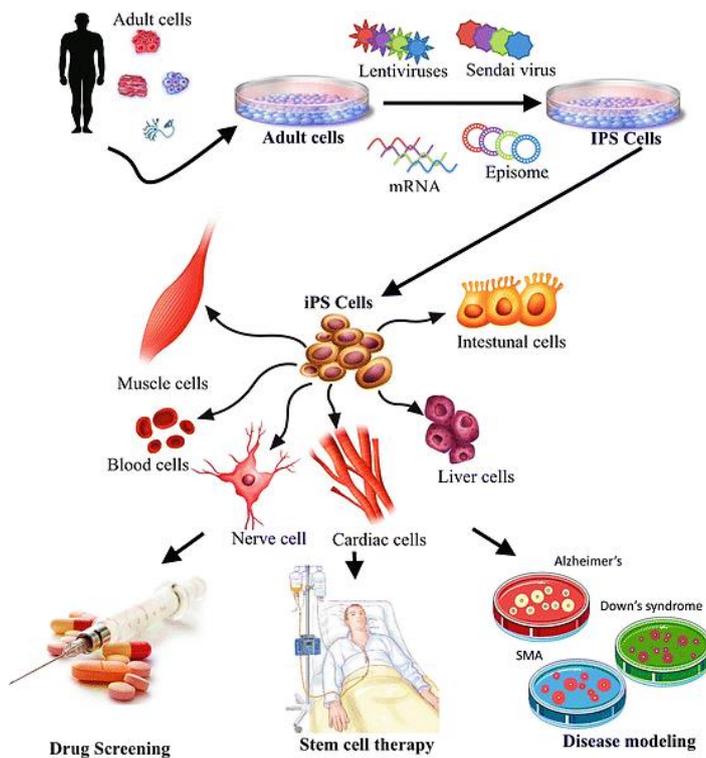


Figure 19. Applications des cellules souches pluripotentes induites (Van Pham et al., 2016)

Les CSPi obtenues peuvent être utilisées pour le développement de médicaments, la thérapie par cellules souches et la modélisation de la maladie.

A. Modélisation pathologique

L'identification des mécanismes pathologiques sous-jacents aux maladies humaines joue un rôle clé dans la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques. Les modèles animaux ont fourni jusque-là des outils précieux pour la modélisation des maladies humaines, permettant l'identification de mécanismes pathologiques à des stades de développement distincts et dans des types de cellules spécifiques dans un cadre *in vivo* ou *in vitro* pour les cultures primaires notamment. Cependant, des différences entre les espèces empêchent la récapitulation des phénotypes complets de maladies humaines chez des animaux. A titre d'exemple, l'amyotrophie spinale infantile est une maladie neuromusculaire associée à la perte d'expression du gène SMN1 (*telomeric survival motor neuron*). Or, uniquement l'Homme possède une copie centromérique du gène SMN1 appelé SMN2, qui permet de compenser partiellement la perte du gène SMN1. Les souris ne possédant qu'un seul gène SMN, la déplétion de ce gène aboutit à la léthalité embryonnaire. Le développement d'un modèle murin de cette pathologie a ainsi reposé sur la mise en place d'un modèle plus complexe basé sur la déplétion du gène SMN et l'introduction du transgène SMN2 (Monani, 2000). Dès lors, la génération de CSPi humaines dérivées de fibroblastes de la peau ou de cellules sanguines de patients constituent une ressource biologique très intéressante pour la modélisation de cette maladie. En raison de leurs propriétés intrinsèques d'auto-renouvellement et de leur potentiel de différenciation

en tous les types de cellules, les CSPi provenant de patients peuvent fournir de grandes quantités de cellules portant un génome causant la maladie. Plus encore, comme les CSPi peuvent être dérivées des patients atteints d'une maladie mais présentant une progression de la pathologie très différente, elles permettent une modélisation personnalisée de la maladie.

Depuis 2008, de nombreuses lignées de CSPi dérivées de patients ont été générées (Park et al., 2008). Les CSPi peuvent être utilisées pour étudier le processus cellulaire pathologique de nombreuses maladies, telles que les maladies hématopoïétiques, neurologiques, cardiovasculaires, hépatiques et autres maladies héréditaires (Ebert et al., 2012; Juopperi et al., 2011). Concernant les maladies neurologiques, plusieurs modèles pathologiques générés à partir de CSPi ont été utilisés avec succès comme par exemple les modèles pour la sclérose latérale amyotrophique (Dimos et al., 2008; Richard and Maragakis, 2015), le syndrome de Down (Park et al., 2008), le syndrome de l'X fragile (Urbach et al., 2010), et la maladie de Parkinson (Byers et al., 2012; Soldner et al., 2009). Des phénotypes cellulaires ont également été identifiés dans des cellules différenciées à partir de CSPi provenant de patients souffrant de différentes maladies, par exemple la diminution de la survie des neurones moteurs différenciés à partir de CSPi de patients atteints d'amyotrophie spinale infantile (Lin et al., 2017). La modélisation pathologique est par conséquent facilitée par l'accès à des cellules de patients porteurs de la mutation causale liée à une pathologie, mais également possible pour les autres types de maladies telles que les pathologies multifactorielles, liées à l'âge ou aux infections virales par exemple.

Il existe différents obstacles à la modélisation des maladies notamment la persistance de l'identité embryonnaire ou foetale dans les tissus dérivés, ainsi que la variabilité génétique pour les maladies génétiques principalement. Ainsi, les modèles de maladies monogéniques peuvent être obtenus par l'isolement de CSE à partir de blastocystes après un DPI, par reprogrammation de cellules somatiques de patients ou par mutagenèse du gène responsable de la maladie (Avior et al., 2016). Les maladies chromosomiques peuvent être modélisées à partir de CSE présentant des aberrations chromosomiques ou de CSE isolées à partir d'embryons, ou par reprogrammation des cellules de patients atteints de troubles chromosomiques. Les modèles dérivés de CSP sont facilement mis en place pour l'étude des maladies monogéniques ayant une apparition précoce au cours du développement. En revanche, pour des maladies complexes ayant une apparition clinique tardive, la modélisation de la maladie peut s'avérer plus difficile. Une solution est d'accélérer les processus pathogènes ou bien le vieillissement des cellules par stress oxydatif notamment ou grâce

au potentiel de la progérine (Mahmoudi and Brunet, 2012; Srikanth and Young-Pearse, 2014). C'est le cas pour la maladie de Parkinson où les neurones dérivés de CSPi provenant de patients atteints de cette maladie reproduisent avec succès plusieurs phénotypes liés à la maladie après avoir induit un stress accélérant le vieillissement des cellules (Bose and Beal, 2019).

L'un des défis majeurs de la modélisation pathologique est la discrimination entre les phénotypes *in vitro* résultant de la mutation causale spécifique et ceux de simples variations inter-individuelles. Les récents progrès de la technologie d'édition du génome permettent désormais de corriger les mutations génétiques pathogènes dans les CSPi dérivées de patients, permettant ainsi de produire des lignées isogéniques apparentées. Les technologies d'édition génomique, qui utilisent des outils tels que les ZFN (*Zinc-Finger Nucleases*), les TALEN (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) et CRISPR-Cas9 (Ben Jehuda et al., 2018; Gaj et al., 2013; Gupta and Musunuru, 2014), ont permis d'améliorer l'efficacité de l'édition des gènes dans les CSPi en coupant des régions spécifiques du génome et effectuer des substitutions de séquences. Les différentes approches de modélisation pathologique peuvent être schématisées dans la figure 20.

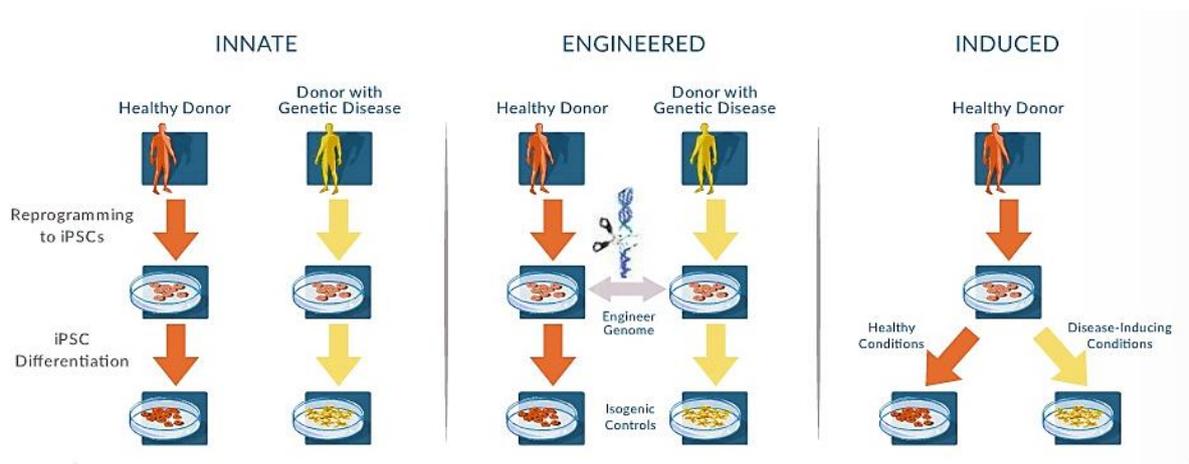


Figure 20. Différentes approches de modélisation pathologique (Comley, 2016)

B. Développement de médicaments

La mise au point de ces nouveaux modèles pathologiques ouvre de nouvelles voies dans la recherche pharmacologique en permettant de mesurer l'efficacité, les effets et la toxicité de nombreuses molécules sur du matériel pathologique. De nombreux tests de criblage des médicaments sont basés sur des cibles considérées comme pertinentes pour les mécanismes de la

maladie. Plusieurs criblages de médicaments utilisant des CSPi et portant sur de petites chimiothèques ont été décrits afin d'évaluer des milliers de composés pour plusieurs maladies et plusieurs candidats cliniques (Charbord et al., 2013; McNeish et al., 2015; Mullard, 2015; Naryshkin et al., 2014). Par exemple, aujourd'hui le seul médicament approuvé pour les patients atteints d'amyotrophie spinale latérale (ALS) est le Riluzole® (Sanofi). Cependant, le mécanisme d'action de ce médicament reste controversé. De ce fait, de nouvelles cibles thérapeutiques ont été étudiées telles que l'inhibition des canaux sodiques, la modulation des canaux potassiques, ou l'inhibition de l'activité du glutamate (Bellingham, 2011). À ce jour, sept composés testés pour l'ALS ont donné des résultats positifs en phase 2, mais aucun n'a pour le moment donné de résultats positifs dans une étude pivot de phase 3 (McNeish et al., 2015).

D'une façon générale, le criblage de molécules à potentiel thérapeutique se concentre sur l'identification de « hits », c'est-à-dire de composés actifs pour une activité biologique désirée, qui répondent à des cibles moléculaires ou à des exigences phénotypiques spécifiques. Cependant, en raison de différences connues dans la physiologie, le métabolisme et la tolérance entre les espèces, on peut constater un manque de translation important entre les procédures actuelles de tests et les résultats cliniques. Dans ce contexte, les modèles cellulaires dérivés directement de CSPi de patients permettent d'identifier des mécanismes et des cibles pertinents dans un environnement humanisé qui offre une plateforme unique et illimitée qui peut récapituler les aspects des maladies humaines, et où les phénotypes associés à la maladie et les essais physiologiquement pertinents peuvent mener à la mise au point préclinique de molécules à potentiel thérapeutique (Engle and Puppala, 2013).

Lorsque les modèles dérivés de CSPi sont utilisés pour le criblage de médicaments, deux aspects essentiels sont à considérer : la biologie de la maladie soutenant la pertinence du phénotype cellulaire qui est criblé et la translation de ce phénotype. Plusieurs stratégies sont ainsi mises en place pour réaliser le criblage de molécules. L'une de ces stratégies est le criblage ciblé qui consiste à tester un nombre relativement faible de molécules pour corriger le phénotype de la maladie dans le modèle cellulaire, en découvrant simultanément des voies ou des cibles dérégées. Les molécules candidates sont généralement sélectionnées sur la base de la prédiction de cibles pertinentes pour la maladie. L'autre stratégie est le criblage à haut débit basé sur l'utilisation de chimiothèques permettant d'identifier de nouvelles molécules qui peuvent corriger des phénotypes cellulaires pathologiques, particulièrement utile pour les maladies dont les mécanismes moléculaires sont mal définis, avec la possibilité de révéler des mécanismes encore inconnus.

Des recherches sur la dysautonomie familiale, un trouble génétique rare du système nerveux périphérique, ont utilisé les CSPi dérivées de patients pour modéliser la maladie et trouver de nouvelles cibles thérapeutiques pour réaliser des criblages (Slaugenhaupt, 2003). Ces recherches ont révélé l'intérêt de la kinétine, une hormone de croissance végétale, à restaurer partiellement le phénotype en corrigeant l'épissage aberrant d'un ARN et à réduire la dégénérescence de certaines populations neuronales (Kadlecová et al., 2019; Lee et al., 2009; Slaugenhaupt, 2003). La kinétine est actuellement en phase 1 de l'essai clinique. Pour illustrer avec un autre exemple, une étude réalisée par les équipes du laboratoire I-Stem a permis de mettre en avant les effets bénéfiques de la metformine sur certaines dérégulations de l'épissage alternatif connues pour être associées à la dystrophie myotonique de type I. Cette étude s'est basée sur l'utilisation de dérivés de CSP humaines portant la mutation causale de la maladie. Les résultats ont révélé que la metformine favorisait un effet correcteur sur plusieurs défauts d'épissage associés à la pathologie. Les effets observés de la molécule se sont avérés compatibles avec les doses thérapeutiques utilisées dans une étude clinique impliquant des patients diabétiques, mettant en évidence le potentiel de la metformine pour d'autres maladies en plus de celles directement liées à un épissage alternatif défectueux (Laustriat et al., 2015). Un essai clinique a été réalisé permettant de démontrer un certain effet bénéfique de la metformine sur la mobilité et les capacités de marche des patients myotoniques (Bassez et al., 2018).

L'utilisation des CSPi permet d'améliorer la découverte et le développement de médicaments en fournissant des outils simples, reproductibles et économiquement efficaces pour le criblage et l'étude de la toxicité des médicaments en cours de développement et, d'autre part, pour l'étude du mécanisme et des voies de la maladie (Csöbönyeiová et al., 2016). De plus, la capacité à différencier les CSPi dans des formats miniaturisés compatibles avec du criblage de molécules à haut débit, augmente la pertinence de ces cellules.

C. Thérapie cellulaire

Outre la modélisation pathologique et la découverte de médicaments, les CSPi humaines peuvent aussi être utilisées en thérapie cellulaire pour de nombreuses maladies dégénératives pour lesquelles il n'existe actuellement pas de médicaments ou de thérapies efficaces (Hirschi et al., 2014; Kiskinis and Eggan, 2010). On compte aujourd'hui une dizaine d'essais cliniques de thérapies cellulaires pour diverses pathologies telles que la maladie de Parkinson, la dégénérescence maculaire

liée à l'âge, les défauts du cartilage, les troubles de la cornée, les lésions de la moelle épinière (Yamanaka, 2020).

L'utilisation des CSP en thérapie cellulaire pour la maladie de Parkinson est aujourd'hui un défi majeur. La première thérapie cellulaire utilisant des CSPi humaines a débuté en 2018 avec l'intention de transplanter des progéniteurs de neurones dopaminergiques dérivés de CSPi humaines dans la substance noire (Takahashi, 2019, 2020). Cette étude est la première à proposer un traitement à la maladie de Parkinson par thérapie cellulaire basée sur l'utilisation de CSPi humaines par opposition à un modèle induit chimiquement. Sept patients présentant une forme modérée de la maladie de Parkinson ont été sélectionnés pour cette étude pour recevoir une transplantation précoce, et leurs progrès devaient être suivis pendant deux ans. Actuellement, les résultats ne sont pas encore connus.

L'une des promesses de la thérapie cellulaire basée sur les CSPi est la médecine personnalisée, possible grâce à l'utilisation spécifique des cellules somatiques du patient. Les cellules somatiques peuvent être récoltées et reprogrammées à l'aide de méthodes sans intégration pour produire à large échelle des CSPi de grade clinique. L'avantage principal de l'utilisation en thérapie des cellules provenant du patient est l'affranchissement du rejet immunitaire. Le premier essai clinique utilisant des CSPi humaines a été réalisé en 2014, et a consisté à transplanter des cellules d'épithélium pigmentaire rétinien humain dérivé de CSPi pour traiter la dégénérescence maculaire (Mandai et al., 2017). Un an après la transplantation, la vue d'un des patients de l'essai clinique s'est améliorée. Cet essai a dû cependant s'arrêter après le recrutement de seulement deux patients du fait de la détection de mutations dans le génome des CSPi utilisées pour produire les greffons.

Les CSPi sont devenues incontournables dans le domaine des cellules souches, grâce en grande partie à leur absence d'immunogénicité et de contrainte éthique, détrônant ainsi la prédominance des CSE dans un certain nombre de domaines d'application. Les CSPi humaines ont montré leur intérêt dans la modélisation cellulaire des maladies, aussi bien pour l'étude des mécanismes physiopathologiques *in vitro* que pour le criblage, la recherche et le développement de nouveaux médicaments. La thérapie cellulaire à partir de CSPi humaines est par ailleurs déjà en cours pour plusieurs maladies (maladie de Parkinson, rétine, etc...).

Chapitre 3 : Synapse neuromusculaire

La doctrine des neurones est un concept formé au début du XX^{ème} siècle qui décrit les propriétés des neurones. Cette doctrine était à l'époque l'une des deux grandes théories sur la composition du système nerveux. Les partisans de la doctrine affirmaient que le système nerveux était composé d'unités cellulaires individuelles. Les partisans de la théorie réticulaire alternative, quant à eux, soutenaient que l'ensemble du système nerveux était un réseau continu de cellules, sans discontinuités ni synapses entre les cellules. Dans les années 1870, le médecin et partisan de la théorie réticulaire Camillo Golgi a mis au point une technique de coloration des neurones ce qui a permis de révéler une cellule neuronale complète et ses structures cellulaires. Plus tard, le neuroscientifique Santiago Ramón y Cajal a utilisé cette coloration pour montrer l'existence de synapses, ou d'espaces entre les neurones, et a soutenu que ses preuves soutenaient la doctrine des neurones. La confirmation de la doctrine des neurones a montré que les neurones fonctionnaient comme des cellules distinctes et indépendantes, et non comme un réseau unique au sein du système nerveux (Glickstein, 2006).

Les synapses, structures par lesquelles les neurones interagissent pour transmettre le message nerveux, sont les principaux centres de traitement de l'information. Au-delà de leur capacité à transmettre un influx nerveux, les synapses ont également la capacité de le moduler : c'est ce que l'on appelle la plasticité synaptique. Il n'est donc pas surprenant que le blocage ou la perte inappropriée de connectivité synaptique entraînent un dysfonctionnement du réseau, et les déficits synaptiques sont l'un des principaux changements subcellulaires qui se produisent avec de nombreux troubles neurologiques.

Le développement de stratégies de plus en plus robustes de différenciation de cellules souches en neurones spécialisés ou en cellules musculaires par exemple, offre une opportunité de modéliser des systèmes synaptiques au niveau neuronal ou neuromusculaire, dans le but d'étudier la transmission synaptique et la plasticité sur des plans moléculaires et électrophysiologiques. Dans le cadre du développement de nouvelles thérapeutiques à base de BoNT, l'étude de la plasticité synaptique au niveau de la synapse neuromusculaire prend ainsi tout son sens.

I. Jonction neuromusculaire

La JNM est à la base de la découverte du principe de synapse chimique. La première démonstration de la transmission synaptique chimique, cholinergique, a été faite par Henry Dale (Dale et al., 1936). Quelques années plus tard, sera mis en évidence la notion de potentiel électrique de la plaque motrice terminale et de libération du neurotransmetteur (del Castillo and Katz, 1954, 1955). La JNM se présente comme la connexion synaptique entre les neurones moteurs et les fibres musculaires. Elle est l'une des premières synapses formées au cours du développement des mammifères. Les JNM sont impliquées dans de nombreux processus cruciaux, et leur bon fonctionnement régit des processus complexes et vitaux. Par conséquent, une formation ou un maintien non approprié de la JNM peut être à l'origine de diverses maladies neurodégénératives ou neuromusculaires. La JNM reste aujourd'hui le modèle le plus étudié pour comprendre les mécanismes impliqués dans la transmission synaptique. Son accessibilité et sa taille en ont fait un modèle de choix pour étudier les interactions entre le nerf et sa cible musculaire.

A. Développement morphologique et moléculaire de la jonction neuromusculaire

La JNM est une synapse cholinergique formée par des neurones moteurs et des fibres musculaires squelettiques primordiales pour la mobilité physique et la vie quotidienne (Sanes and Lichtman, 1999). La JNM possède les caractéristiques structurales des synapses chimiques : la terminaison nerveuse du neurone moteur est remplie de vésicules synaptiques contenant le neurotransmetteur, et est séparée de la membrane musculaire post-synaptique par un espace de 50 à 80 nm de large appelé fente synaptique (Tintignac et al., 2015). Plusieurs types cellulaires différents contribuent à la formation de la JNM : le neurone moteur, la fibre musculaire squelettique et les cellules terminales de Schwann (Court et al., 2008). Les cellules terminales de Schwann sont essentielles pour la bonne formation et la stabilisation de la NMJ, ainsi que sa régénération après une blessure par exemple (Balice-Gordon, 1996).

Structurellement, les axones contrôlant les fibres musculaires proviennent des corps cellulaires des neurones moteurs et croissent, généralement sans ramification, vers les muscles cibles. Les axones des neurones moteurs présynaptiques se ramifient ensuite abondamment et entrent en contact avec de nombreuses fibres musculaires post-synaptiques. Les sites de contact entre les

neurones moteurs et les muscles sont très spécialisés et forment des boutons synaptiques. La terminaison nerveuse présynaptique contient de nombreuses vésicules synaptiques qui sont concentrées dans des zones dites actives et qui contiennent le neurotransmetteur (ACh) qui sera libéré lors de la neurotransmission. Les boutons synaptiques adhèrent à la surface de la cellule musculaire prenant souvent la forme de bretzel. Ils sont ensuite recouverts par les cellules terminales de Schwann (Court et al., 2008; Li et al., 2018) (Figure 21). Lors de l'assemblage de la JNM, les AChR sont regroupés au niveau des crêtes des replis de la membrane post-synaptique de la fibre musculaire à une densité très élevée d'environ $10\ 000\ \text{AChR}/\mu\text{m}^2$, alors que cette densité n'est que de $10\ \text{AChR}/\mu\text{m}^2$ au niveau extrasynaptique (Heuser and Salpeter, 1979; Zhang and Peng, 2011).

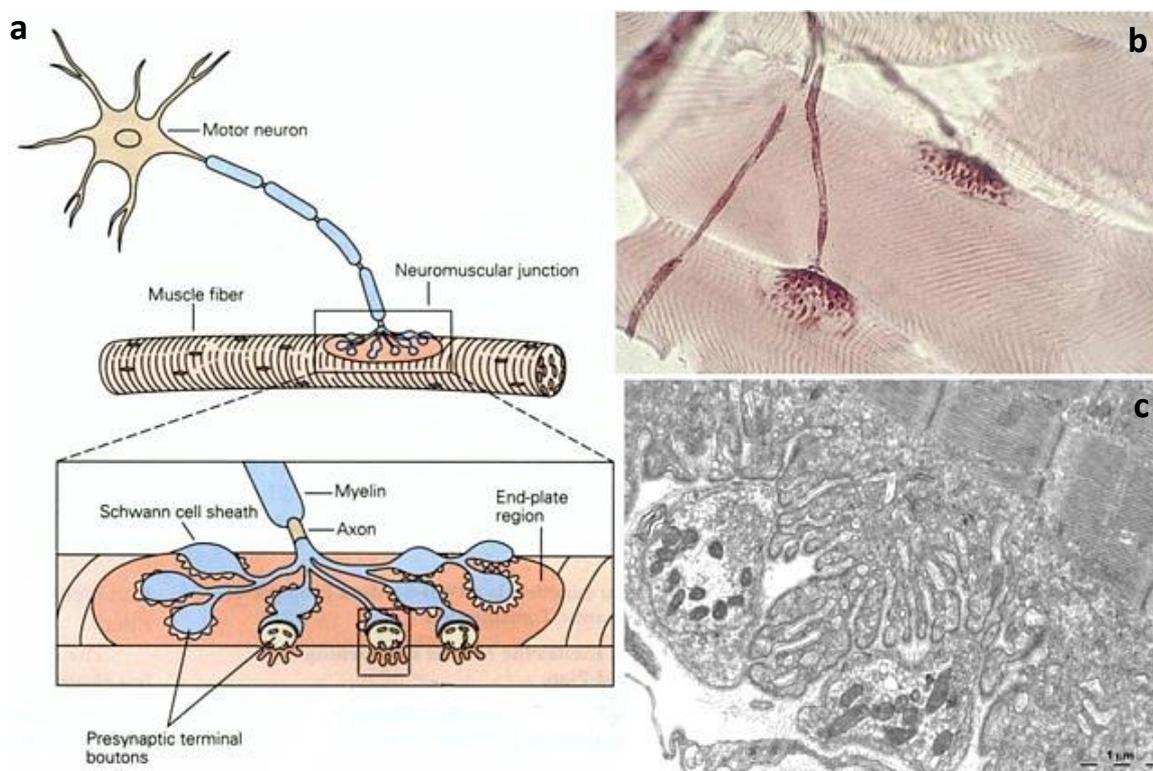


Figure 21. Organisation de la jonction neuromusculaire (Boncompagni, 2012)

(a) Au niveau de la jonction, les axones des neurones moteurs forment des ramifications qui viennent se connecter à la fibre musculaire. Les cellules terminales de Schwann, les ramifications terminales des neurones moteurs et les spécialisations postsynaptiques forment ensemble la JNM. (b) Histologie du muscle squelettique et des neurones moteurs. (c) Microscopie électronique de la JNM.

Le regroupement des AChR est contrôlé par plusieurs signaux dont la voie de signalisation Agrine-MuSK (Wang et al., 2006; Zong and Jin, 2013) (Figure 22). Cette voie est indispensable à la différenciation post-synaptique. Elle met en jeu une protéine, l'agrine, qui possède une forte capacité d'agrégation lorsqu'elle est libérée par le neurone moteur (Gesemann et al., 1995). Le récepteur

MuSK (*Muscle Specific Kinase*) est également impliqué dans la voie de signalisation. Ce récepteur est exprimé spécifiquement dans le muscle au niveau de la membrane post-synaptique. L'agrine se lie à la protéine Lrp4 (*Low-density lipoprotein receptor-related protein 4*) qui lui sert de récepteur au niveau du muscle, ce qui entraîne la phosphorylation et l'activation de la propriété kinase du récepteur MuSK en présence de la protéine Dok-7 (*Downstream of kinase 7*). Une fois phosphorylé, MuSK active une voie de signalisation conduisant à la synthèse des AChR, à leur regroupement, et à la différenciation post-synaptique.

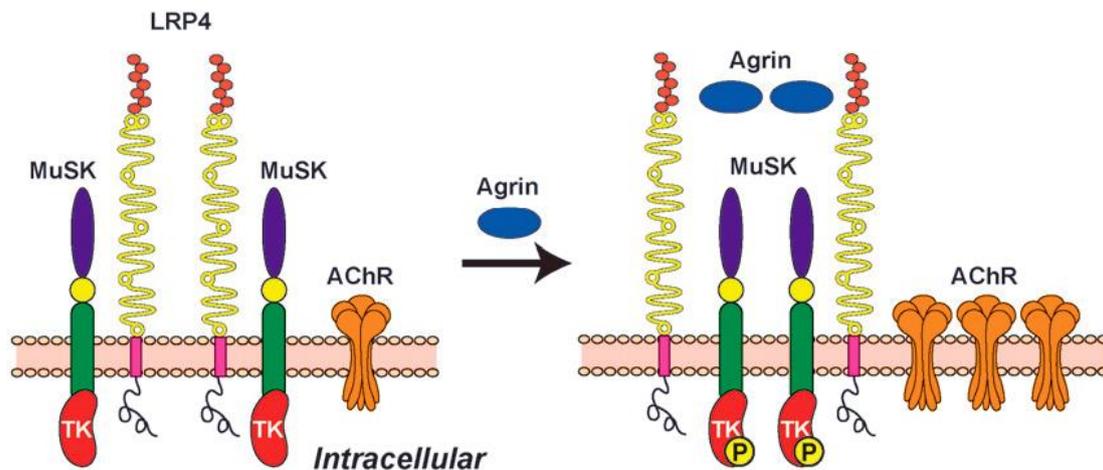


Figure 22. Voie de signalisation Agrine-MuSK (Herz et al., 2009)

La protéine Lrp4 sert de récepteur pour l'agrine et de corécepteur pour MuSK au niveau du muscle. L'activation de MuSK est nécessaire à l'induction de l'agrégation des AChR lors de la formation des JNM. MuSK forme ainsi un complexe avec Lrp4 mais ne se lie pas directement à l'agrine. La liaison de l'agrine à Lrp4 améliore la formation des complexes MuSK avec Lrp4 et induit la phosphorylation de MuSK.

Bien que les JNM de la plupart des vertébrés partagent de nombreuses caractéristiques communes, il existe des différences notamment au niveau de la morphologie et de la conformation des terminaisons nerveuses (Jones et al., 2017; Slater, 2015) (Figure 23).

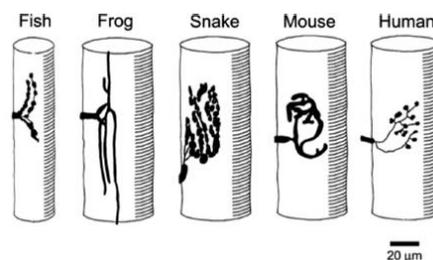


Figure 23. Modèles d'innervation des muscles chez certains vertébrés (Slater, 2017)

B. Mécanisme de la transmission neuromusculaire

Le principal rôle de la JNM est de convertir une séquence temporelle de potentiels d'action dans les neurones moteurs en contractions musculaires. L'arrivée d'un potentiel d'action à la terminaison du neurone moteur entraîne l'ouverture des canaux calciques voltage dépendants au niveau de la terminaison nerveuse. Ceci va provoquer une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire responsable d'une cascade d'événements de signalisation intracellulaire conduisant les vésicules contenant le neurotransmetteur cholinergique (ACh) à migrer vers la surface de la terminaison nerveuse, à fusionner avec la membrane au niveau des zones actives, et à décharger son contenu. L'ACh est ainsi libérée dans la fente synaptique entre le neurone moteur et la fibre musculaire. La faible largeur de la fente synaptique assure une diffusion et une liaison rapide (1 ms) de l'ACh à ses récepteurs situés à la membrane musculaire post-synaptique. La fixation de l'ACh aux récepteurs nicotiques induit l'ouverture de leurs canaux ioniques permettant le passage simultané du sodium dans la fibre musculaire et du potassium hors de celle-ci. Un courant est alors généré dans la fibre musculaire et provoque une dépolarisation locale de la fibre musculaire, appelé potentiel de plaque terminal. Le potentiel créé au niveau de la plaque motrice se propage ensuite le long de la membrane musculaire, convertissant ainsi un signal chimique en une réponse mécanique, ce qui entraîne une contraction du muscle. Le couplage excitation-contraction n'est possible qu'en raison de la propriété d'excitabilité de la membrane plasmique musculaire, et la régulation du Ca^{2+} nécessite une organisation et un développement de structures particulières spécifiques, les triades (Rall, 2014). Les triades représentent une unité fonctionnelle dans la mesure où les récepteurs à la dihydropyridine (situés à la membrane du tubule T) sont liés fonctionnellement à des canaux calciques présents dans la membrane du réticulum sarcoplasmique appelés récepteurs à la ryanodine. Le potentiel d'action initié au niveau de la plaque motrice se déplace suite à l'ouverture de canaux sodiques voltage-dépendants distribuant la dépolarisation aux tubules T qui se dépolarisent et induisent une libération de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique vers le cytosol de la fibre musculaire. En parallèle de la survenue du potentiel d'action, l'AChE (acétylcholinestérase) dégrade l'ACh, ce qui provoque l'arrêt des effets de l'ACh. Les canaux voltage-dépendants se referment ainsi et le potentiel de la membrane est restauré (Deschenes et al., 1994a, 1994b; Martyn et al., 2009; Tintignac et al., 2015; Wood and R. Slater, 2001) (Figure 24).

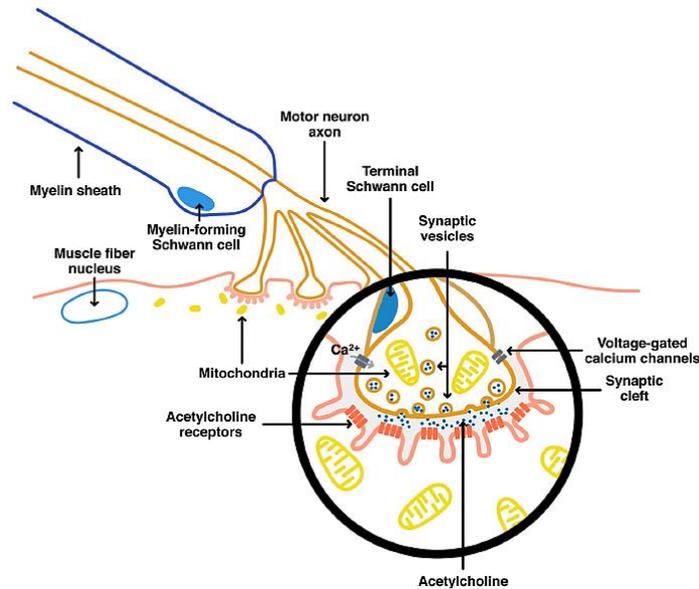


Figure 24. Transmission synaptique à la jonction neuromusculaire (Castellanos-Montiel et al., 2020)

L'arrivée de l'influx nerveux au niveau de la terminaison axonale du neurone moteur entraîne l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants et l'entrée d'ions Ca²⁺. L'augmentation de la concentration en Ca²⁺ dans la terminaison nerveuse déclenche l'exocytose du contenu des vésicules synaptiques. L'ACh libérée dans la fente synaptique se lie aux AChR regroupés sur la fibre musculaire pour favoriser une cascade d'événements qui provoquent la contraction.

II. Développement des composantes présynaptiques et post-synaptiques

A. Développement de la moelle épinière

Au début du développement embryonnaire (période embryonnaire de 3 à 6 semaines chez l'Homme), la gastrulation entraîne la spécification des cellules de la MCI en trois couches germinales (ectoderme, endoderme, mésoderme). La région dorsale de l'ectoderme est ensuite spécifiée dans le neuroectoderme par l'inhibition de la signalisation BMP et de l'activine, ainsi que par la modulation de la signalisation FGF et Wnt. La neuralisation se poursuit ensuite par la formation d'une plaque neurale et la génération de plis neuronaux, qui à leur tour fusionnent pour donner naissance au tube neural. Le tube neural est ensuite modelé le long de l'axe antéro-postérieur par un gradient de RA. Un niveau élevé de RA permet d'une part de délimiter la frontière initiale entre la moelle épinière et le cerveau postérieur, et d'autre part le cerveau antérieur et le cerveau postérieur. Les morphogènes tels que FGF8 et GDF11 (*Growth Differentiation Factor 11*) s'opposent à l'activité du RA et permettent la spécification de différents types cellulaires de la moelle épinière caudale. Une fois la moelle

épinière spécifiée, la libération continue de RA par les somites permet d'affiner le caractère positionnel des neurones le long de l'axe antéro-postérieur. La moelle épinière est également modelée le long de l'axe dorso-ventral par l'action combinée de Shh provenant de la notocorde et de la plaque de plancher, et de la signalisation BMP/TGF- β au niveau de la plaque de toit. La moelle épinière ventrale peut être divisée en domaines progéniteurs qui, grâce à l'action combinée de facteurs de transcription, donneront naissance aux interneurons et aux neurones moteurs. L'action combinatoire des facteurs de transcription permet la spécification de chaque type de cellule (Ashwell, 2009; Davis-Dusenbery et al., 2014) (Figure 25).

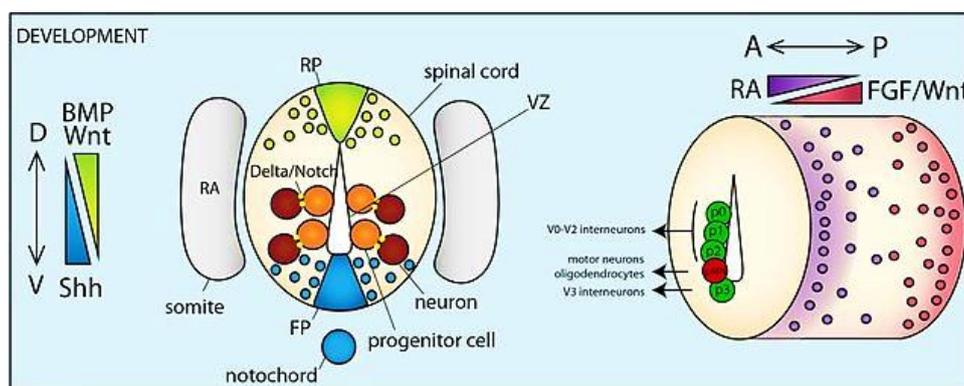


Figure 25. Neurogenèse de la moelle épinière (Cardozo et al., 2017)

Lors de la formation de la moelle épinière, la notocorde et la plaque du plancher sont établies comme centre de signalisation de Shh, qui se diffuse à travers les tissus selon un gradient ventro-dorsal. BMP et Wnt sont libérés par la plaque de toit selon un gradient dorso-ventral. Le long de l'axe antéro-postérieur, la moelle épinière est structurée par l'expression de RA libérée par les somites. Des domaines progéniteurs distincts sont ainsi mis en place et sont à l'origine des interneurons (V0, V2, V3) et des neurones moteurs.

B. Méthodes de différenciation des neurones moteurs à partir des cellules souches pluripotentes induites

Il existe deux principaux types de neurones moteurs : supérieurs qui proviennent du cortex cérébral, et inférieurs qui sont situés dans le tronc cérébral et la moelle épinière. Parmi eux, figurent les neurones moteurs spinaux qui sont localisés dans la corne ventrale de la moelle épinière et qui contrôlent les muscles effecteurs en périphérie. Ils constituent le composant essentiel et irremplaçable du circuit neuronal nerf-muscle. Au cours de l'embryogenèse, la structuration et la spécification des neurones moteurs sont régies par la production et la sécrétion locales de morphogènes bien spécifiques. La manière dont les voies et les morphogènes régulent le développement des neurones moteurs a été très étudiée en particulier chez la souris et le poulet, et

ces études constituent la base des informations utilisées dans les protocoles permettant de reproduire *in vitro* certaines de ces étapes physiologiques pour obtenir des populations de neurones moteurs enrichies à partir de CSPi humaines. Plusieurs protocoles de différenciation de neurones moteurs à partir de CSPi ont été développés au cours des dix dernières années, dont une sélection est présentée dans le Tableau VI, et qui utilisent des morphogènes ou des agonistes synthétiques pour promouvoir la spécification d'une population pure de neurones moteurs. Ces protocoles diffèrent essentiellement par leur durée et leur efficacité à générer des neurones moteurs.

Parmi les facteurs impliqués dans la différenciation des neurones moteurs spinaux, on retrouve principalement l'implication de deux morphogène : le RA et Shh (Lee et al., 2007; Li et al., 2008) et la voie Wnt (Flight, 2009; Maury et al., 2015). Des petites molécules synthétiques telles que la purmorphamine et le SAG qui activent la voie Shh, peuvent se substituer à Shh et, en association avec le RA, favoriser la formation de neurones moteurs ; et le DAPT qui améliore la différenciation des cellules et permet aux précurseurs de sortir du cycle cellulaire (Tan et al., 2016). Le DAPT est également un inhibiteur de la voie Notch, ce qui favorise la différenciation en neurones moteurs par interruption de l'activité de Notch connu pour favoriser la différenciation vers les types de cellules gliales (Crawford and Roelink, 2007). Au cours du processus de différenciation, la survie des neurones moteurs et la croissance des neurites sont stimulées par les facteurs neurotrophiques tels que le BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*), le GDNF (*Glial cell line- Derived Neurotrophic Factor*), et le CNTF (*Ciliary Neurotrophic Factor*), ainsi que le AA (acide ascorbique) (Zurn et al., 1996). Outre ces facteurs, l'IGF1 peut également participer à la croissance axonale (Nieto-Estévez et al., 2016). A ce stade de différenciation des neurones moteurs, les concentrations de RA et de Shh doivent être réduites, car à des concentrations trop élevées la différenciation cellulaire est inhibée (Hu and Zhang, 2009).

Dans le cadre du projet de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés au protocole de différenciation des neurones moteurs spinaux mis en place au laboratoire I-Stem (Maury et al., 2015). Ce protocole est aujourd'hui utilisé en routine au laboratoire et a prouvé sa robustesse et son efficacité à générer plus de 75% de neurones moteurs grâce à la différenciation de CSPi humaines.

Tableau VI : Exemples de protocoles d'induction de neurones moteurs à partir de CSPi

Référence	Méthode	Facteurs différenciation et maturation	Durée différenciation	Efficacité
(Dimos et al., 2008)	EB	Shh, RA, CNTF, BDNF, GDNF	~40 jours	20%
(Ebert et al., 2009)	EB	Shh, RA, BDNF, GDNF, AMPc, AA	50-100 jours	<20%
(Karumbayaram et al., 2009)	EB	RA, Purmorphamine, Shh, CNTF, BDNF, GDNF	35-50 jours	<50%
(Zeng et al., 2010)	Rosettes	Shh, RA, FGF8, BDNF, GDNF, IGF1	~24 jours	>80%
(Corti et al., 2012)	Rosettes	Shh, RA, BDNF, GDNF, IGF1	~24 jours	>70%
(Burkhardt et al., 2013)	EB	RA, SAG, DAPT, CNTF, BDNF, GDNF	~32 jours	NR
(Du et al., 2015)	Progéniteurs neuroépithéliaux	RA, Purmorphamine, Composé E	~16 jours	>80%
(Maury et al., 2015)	EB	RA, SAG, DAPT, BDNF, GDNF	~30 jours	>75%

AA : acide ascorbique ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; BDNF : *brain derived neurotrophic factor* ; CNTF : *ciliary neurotrophic factor* ; CSPi : cellules souches pluripotentes induites ; EB : corps embryonnaires ; FGF8 : *fibroblast growth factor 8* ; GDNF : *glial cell line-derived neurotrophic factor* ; IGF1 : *insulin-like growth factor* ; NR : non renseigné ; Shh : *sonic hedgehog* ; RA : acide rétinoïque

C. Méthodes de différenciation des fibres musculaires squelettiques

Les fibres musculaires se développent à partir de cellules progénitrices du mésoderme au cours de l'embryogenèse. Le mésoderme est segmenté en somites qui se trouvent de chaque côté du tube neural. La partie ventrale des somites, appelée le sclérotome, donne naissance au squelette axial tandis que sa partie dorsale, le dermomyotome, donne naissance au derme et aux muscles squelettiques du corps et des membres. Un large spectre de molécules de signalisation instruit la myogenèse pendant le développement embryonnaire et la vie postnatale (Bentzinger et al., 2008).

La première étape de la myogenèse est contrôlée par des molécules de signalisation dont Shh et Wnt provenant du tube neural, qui conduisent à l'expression de gènes de détermination myogénique, Myf5 (*Myogenic factor 5*) et MyoD (*Myoblast Determination protein 1*). Après cette étape, les myoblastes migrent et prolifèrent jusqu'à atteindre leurs sites de différenciation grâce à l'intervention du facteur de diffusion HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) et de son récepteur (Dietrich et al., 1999). D'autres facteurs de transcription dont Pax3 (*Paired box gene 3*), Pax7 (*Paired box gene 7*) et Lbx1 (*Ladybird homeobox 1*) sont également impliqués dans la migration des cellules (Buckingham et al., 2003). Les myoblastes se différencient ensuite sous l'action de divers facteurs de

transcription myogéniques, pour générer les fibres musculaires. Deux phases successives, la myogenèse primaire et secondaire, se produisent donnant lieu aux myotubes primaires, considérés comme des fibres musculaires immatures, puis aux myotubes secondaires qui se soit par fusion de myoblastes avec des myotubes primaires, soit en utilisant les myotubes primaires pour fusionner directement avec eux (Cossu and Biressi, 2005). Ainsi, les myoblastes mononucléés en fusionnant avec les myotubes primaires, entraînent la formation de myotubes multinucléés. A l'intérieur de ces myotubes, les filaments de myosine et d'actine s'organisent pour former les sarcomères étant les unités fonctionnelles de la contraction musculaire. Des chaînes de sarcomères, appelées myofibrilles, s'alignent dans les myotubes en cours de maturation. Les myotubes matures contiennent des myofibrilles bien organisées et alignées, qui donnent naissance au motif strié caractéristique des fibres musculaires squelettiques. Enfin, une autre population de myoblastes quiescents, les cellules satellites, se retrouve le long de la fibre musculaire. Ces cellules sont capables d'une part de se différencier en fibres musculaires permettant la régénération du muscle après une lésion, et d'autre part de s'auto-renouveler pour reconstituer une niche cellulaire (Buckingham et al., 2003; Chazaud, 2018) (Figure 26).

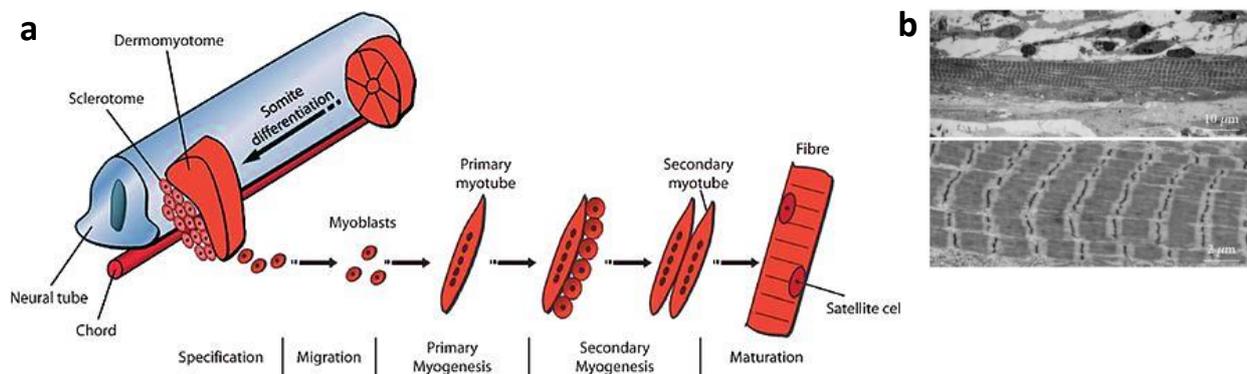


Figure 26. Formation du muscle squelettique (Charrasse et al., 2003; Jiwwawat et al., 2018)

(a) Les somites se forment et se développent en suivant un gradient rostro-caudal. Les cellules constituant les somites sont déterminées à entrer dans la lignée myogénique et sont capables de proliférer et de se diviser pour établir un pool de myoblastes. Des signaux spéciaux font que les myoblastes sortent du cycle cellulaire, cessent de se diviser et se différencient. Ils commencent à exprimer des protéines spécifiques aux cellules musculaires et finissent par fusionner pour former des myotubes multinucléés, jusqu'à donner naissance à la fibre musculaire. (b) Les sarcomères matures s'assemblent en myofibrilles dans les fibres musculaires squelettiques.

Il est important de noter qu'outre les molécules diffusibles comme les facteurs de croissance et les morphogènes, l'interaction des progéniteurs des cellules musculaires avec les cellules

avoisinentes (cellules satellites) et avec la matrice extracellulaire, est également impliquée dans la régulation de la myogenèse.

La mise au point de protocoles de différenciation en cellules musculaires squelettiques générées à partir de CSP a longtemps été limitée et difficile, jusqu'au développement de deux stratégies. La première implique la surexpression de transgènes, notamment Pax7, qui est le facteur de transcription principal des cellules satellites (Sambasivan et al., 2011). Des cellules satellites ont ainsi été produites à partir de CSP et ont démontré leur capacité d'expansion et de différenciation *in vitro*, ainsi que leur capacité de greffe *in vivo* et une contribution à la formation de fibres musculaires chez des souris immunodéficientes (Darabi et al., 2012; Magli et al., 2017). La seconde stratégie consiste à utiliser des petites molécules pour développer la différenciation sans l'aide de transgène. Après avoir employé l'inhibition de la GSK-3 β (*Glycogen Synthase Kinase 3 β*) pour activer la voie Wnt, la stratégie consiste à utiliser le facteur de croissance FGF2 et à cultiver les cellules dans un milieu minimal (Caron et al., 2016; Chal and Pourquoié, 2017; van der Wal et al., 2018). La différenciation myogénique a, dans certains cas, été favorisée par l'inhibition de BMP4 (Chal et al., 2015), et dans d'autres cas le DAPT a substitué le FGF2 (Choi et al., 2016). Bien que ces protocoles de différenciation permettent d'obtenir des cultures homogènes, le niveau de maturité des cellules musculaires squelettiques générées reste discutable.

D. Mise en place d'un réseau neuromusculaire actif *in vitro*

Au cours des dernières décennies, une variété de modèles et d'approches ont été développés afin de déchiffrer les mécanismes impliqués dans le développement et le fonctionnement de la JNM. L'incidence et la prévalence des pathologies neuromusculaires augmentant, le développement de modèles d'étude pertinents pour concevoir des traitements efficaces est apparu indispensable. Dans ce contexte, différentes approches ont été développées *in vitro* afin de recréer la JNM compatible avec des analyses à moyen et haut débit, permettant d'avancer à la fois dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques mais également pour identifier de nouvelles approches thérapeutiques (Natarajan et al., 2019).

Au début du XX^{ème} siècle, R.G. Harrison observe pour la première fois que des explants de myotomes attachés à des fragments de tissu médullaire embryonnaire de grenouille se différencient en fibres musculaires contractiles (Harrison, 1959). Comme les cellules musculaires de la grenouille ne se contractent pas spontanément, il en conclut que les contractions étaient induites par les nerfs.

A la suite de cette découverte, il a été démontré que les cellules musculaires présentaient des contractions spontanées *in vitro*. Au début des années 1960, la culture d'explants entiers de moelles épinières embryonnaires de certains animaux (grenouille, rat, poussin) a fourni des preuves morphologiques et fonctionnelles étayant l'idée d'un modèle *in vitro* de JNM (Corner and Crain, 1965; Peterson et al., 1965). Depuis, de nombreux modèles *in vitro* de JNM ont vu le jour, chacun présentant des particularités et proposant des conditions de culture spécifiques en 2D, 3D ou même en condition hybride (Figure 27).

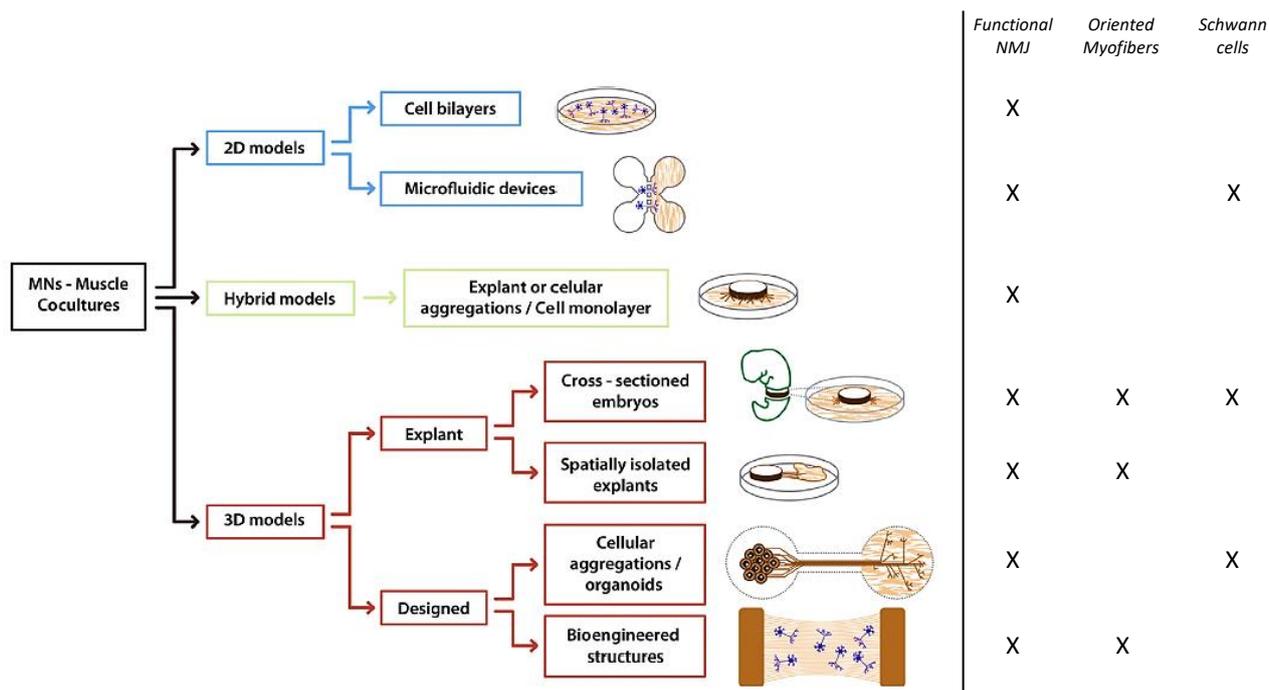


Figure 27. Modèles *in vitro* de jonction neuromusculaire (Castellanos-Montiel et al., 2020)

Au fur et à mesure des années, un effort a été fait sur le développement de modèles *in vitro* entièrement humanisés (Barbeau et al., 2020) (Tableau VII). L'avènement des CSP a permis d'envisager le développement de modèles humanisés de JNM (Afshar Bakooshli et al., 2019; Marteyn et al., 2011; Santhanam et al., 2018; Shimojo et al., 2015; Steinbeck et al., 2016; Vila et al., 2019). Pour chacun de ces modèles, des contractions des fibres musculaires ont été observées après quelques semaines de culture, mettant en évidence une certaine fonctionnalité de la JNM créée *in vitro*. Mais l'utilisation des cellules primaires présente certaines limites, telles que la variabilité des donneurs qui influe sur la différenciation des cellules et la capacité proliférative restreinte de ces cellules (Nikolić et al., 2017). De récents progrès au niveau des protocoles de différenciation des cellules musculaires

ont rendu possible la mise en coculture de neurones moteurs dérivés de CSPi humaines avec des cellules musculaires squelettiques dérivées elles aussi de CSPi humaines, limitant ainsi la variabilité ce qui permet d'envisager la possibilité de générer des modèles pathologiques issus du même patient (Demestre et al., 2015; Maffioletti et al., 2018; Mazaleyrat et al., 2020; Osaki et al., 2020; Puttonen et al., 2015; Swartz et al., 2020). Ces modifications ont notamment permis de produire des systèmes contractiles et fonctionnels avec une mesure possible de la mobilisation calcique. De plus, les progrès au niveau des protocoles ont également amené à développer des systèmes plus complexes que les systèmes de culture 2D communément utilisés. En effet, des systèmes de puces microfluidiques et des systèmes 3D se sont développés, et permettent un véritable contrôle du microenvironnement cellulaire et des interactions entre les populations cellulaires au sein du système (Afshar Bakooshli et al., 2019; Maffioletti et al., 2018; Santhanam et al., 2018; Vila et al., 2019). Au niveau fonctionnel, ces systèmes augmentent la contractilité des fibres musculaires et miment plus précisément la physiologie *in vivo*. Cependant, les systèmes 3D et microfluidiques présentent quelques inconvénients. En effet, certaines matrices utilisées dans ces systèmes incorporent des composés d'origine animale ou d'autres sources indésirables qui peuvent interférer avec la culture des cellules. L'interaction avec la matrice peut ainsi influencer la réponse à des molécules testées lors du développement de médicaments. De plus, la performance, la sensibilité et la compatibilité de ces systèmes avec le haut débit en reste limité.

Par ailleurs, malgré les progrès réalisés dans le développement de protocoles de différenciation de fibres musculaires squelettiques à partir de CSPi humaines, le niveau de maturation des cellules musculaires générées reste contestable. En effet, les fibres générées sont immatures et ne peuvent donc être classées comme des fibres de type I ou II, ce qui peut réduire la pertinence de l'utilisation des CSPi pour la modélisation de pathologies neuromusculaires qui affectent préférentiellement certains types de fibres musculaires squelettiques (Talbot and Maves, 2016).

Tableau VII : Exemples de modèles humanisés *in vitro* de jonction neuromusculaire (Barbeau et al., 2020)

Reference	All from hPSCs	Cell origin	Co-culture duration	2D/3D
Guo et al. (2011)		Human primary myoblasts and hESC-derived MNs	2-3 weeks	2D
Marteyn et al. (2011)		Human primary myoblasts and hESC-derived MNs	2 weeks	2D
Puttonen et al. (2015)	Yes	hESC mixed differentiation	Up to 6 weeks	2D
Steinbeck et al. (2016)		Human primary myoblasts and hESC-derived MNs	6-8 weeks	2D
Osaki et al. (2018)	Yes	hiPSC-derived muscle cells and hiPSC-derived MNs	2 weeks	3D
Maffioletti et al. (2018)	Yes	hiPSC-derived muscle cells, hiPSC-derived MNs and hiPSC-derived endothelial cells	2 weeks	3D
Santhanam et al. (2018)		Human primary myoblasts and hiPS-derived MNs	2 weeks	2D microfluidic
Afshar Bakooshi et al. (2019)		Human primary myoblasts and hESC-derived MNs	2 weeks	2D versus 3D
Vila et al. (2019)		Human primary myoblasts and Chr2-expressing hiPSC-derived MNs	3 weeks	3D microfluidic
Lin et al. (2019)	Yes	hiPSC-derived muscle cells and hiPSC-derived MNs	Up to 100 days	2D
Picchiarelli et al. (2019)	Yes	hiPSC-derived muscle cells and hiPSC-derived MNs	3 weeks	2D
Bellmann et al. (2019)	Yes	hiPSC-derived muscle cells and hiPSC-derived MNs	3 weeks	3D microfluidic
Faustino-Martins et al. (2020)	Yes	hiPSCs and hESCs	Up to 150 days	3D organoids
Kim et al. (2020)		hMPCs and hNSCs	10 days	3D bioprinting
Mazaleyrat et al. (2020)	Yes	Concomitant differentiation of hiPSC-derived muscle cells and hiPSC-derived MNs	30 days up to 7 months	2D

Chr2 : *channelrhodopsin 2* ; hESCs : *human embryonic stem cells* ; hiPSCs : *human induced pluripotent stem cells* ; hMPCs : *human mesenchymal pluripotential cells* ; hNSCs : *human neural stem cells* ; hPSCs : *human pluripotent stem cells* ; MNs : neurones moteurs

Il n'existe pas encore de modèle *in vitro* totalement fiable et représentatif permettant d'étudier en détail tous les aspects de la JNM. En effet, une modélisation complète de la JNM mettrait en jeu tous les types cellulaires impliqués dans la formation, le maintien et la survie de la jonction dont les cellules de Schwann, ainsi que toutes les interactions moléculaires établies. Cependant, les progrès réalisés au cours des dernières années ont entraîné la conception d'une diversité de modèles, dont certains sont adaptés pour comprendre les caractéristiques anatomiques, tandis que d'autres fournissent de meilleures indications sur les propriétés physiologiques et fonctionnelles. Aujourd'hui, il est important de générer des modèles qui intègrent tous les types de cellules impliquées dans la formation, le maintien et la maturation de la JNM, également d'un environnement de culture des

cellules fiable, afin d'augmenter la pertinence des modèles pour les transposer de la recherche aux études préclinique.

III. Etude de la fonctionnalité synaptique

Le nombre et la force des synapses changent tout au long du développement, ainsi qu'à l'âge adulte, à mesure que des nouvelles synapses se créent, sont éliminées ou affinées en réponse à l'activité neurale continue. Un certain nombre de techniques se sont développées afin d'évaluer ces changements, notamment l'enregistrement électrophysiologique sur une seule cellule qui permet la mesure des entrées synaptiques avec une haute résolution temporelle, mais l'utilité de cette technique reste limitée pour comprendre les interactions complexes au niveau du réseau (Miles and Poncer, 1996). Des progrès sur la mesure électrophysiologique ont été réalisés afin de proposer une approche semi-automatisables et compatible avec du moyen à haut débit. En parallèle, l'intégration de nouvelles méthodes comprenant les opsines photo-activables et les composés calciques a permis de faciliter le contrôle spatiotemporel de la libération des neurotransmetteurs, permettant une analyse précise des mécanismes d'action présynaptiques et postsynaptiques.

A. Mesure de l'activité électrique et électrochimique par « Microelectrode Array »

La technologie de *Microelectrode Array* ou MEA est aujourd'hui de plus en plus utilisée pour enregistrer de façon prolongée et non invasive l'activité électrophysiologique spontanée des neurones dans un réseau *in vitro*. Le MEA a été introduit dans les années 1970 par Thomas comme un système *in vitro* pour surveiller les effets des médicaments afin de réaliser des études fonctionnelles dans des conditions physiologiques ou pathologiques induites qui miment les dommages *in vivo* (Thomas Jr et al., 1972).

Cette technologie consiste à cultiver des cultures neuronales sur des réseaux de microélectrodes (des dizaines à des centaines). Les cellules sont cultivées directement dans des plaques de culture spécifiques composées des microélectrodes, et mûrissent pour former des réseaux de neurones comprenant des axones, des dendrites et des centaines, voire des milliers de connexions synaptiques. Par conséquent, les cultures sur les MEA représentent un modèle idéal pour l'étude de la connectivité neuronale. Les potentiels d'action, les impulsions électriques des neurones, peuvent

être détectés à l'aide des microélectrodes en mesurant un changement de la tension transmembranaire ou extracellulaire d'une cellule ou d'un réseau. Dans un réseau de neurones interconnectés, il est possible d'observer des salves organisées de potentiels d'action et/ou une activité synchronisée détectée à travers plusieurs électrodes du réseau (Soscia et al., 2020) (Figure 28). Les données temporelles et l'organisation spatiale et la synchronisation des potentiels d'action peuvent fournir des informations cruciales sur la santé et la communication au sein d'une population de neurones (Obien et al., 2015; Spira and Hai, 2013).

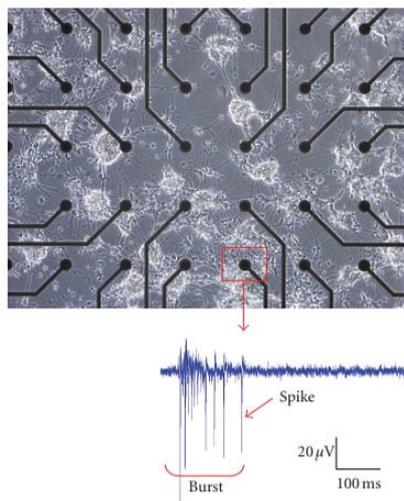


Figure 28. Réseau de neurones interconnectés sur des microélectrodes (Novellino and Zaldívar, 2010)

Des neurones sont cultivés sur des microélectrodes et leur activité électrophysiologique est enregistrable, représentée par des pics d'activités et des salves.

Dans le domaine de la neurologie, la technologie de MEA a été utilisée pour étudier l'épilepsie dans un modèle de neurones dérivés de CSPi humaines. Une étude s'est intéressée à la toxicité de médicaments ayant des propriétés convulsivantes et aux effets neurologiques de médicaments anticonvulsivants (Odawara et al., 2018). Cette technologie offre également la possibilité d'évaluer les altérations phénotypiques induites par les maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson ou la sclérose latérale amyotrophique par exemple, où des études ont permis de caractériser la réponse électrophysiologique à des composés, de neurones dopaminergiques et neurones moteurs dérivés de CSPi humaines portant des mutations impliquées dans la maladie (Ronchi et al., 2020). De la même façon, une étude de MEA a mis en évidence le potentiel des astrocytes dérivés de CSPi humaines en coculture avec des neurones moteurs dérivés de CSPi

humaines à améliorer la maturation électrophysiologique des neurones moteurs et donc à augmenter significativement l'activité électrophysiologique de ces neurones. Cette étude a également révélé que réciproquement les neurones moteurs favorisaient la maturation des astrocytes en coculture (Taga et al., 2019).

B. Mesure de la dynamique calcique

Les ions Ca^{2+} génèrent des signaux intracellulaires essentiels dans une grande variété de fonctions, y compris le contrôle de la contraction des cellules musculaires, ainsi que la régulation des aspects vitaux de l'ensemble du cycle cellulaire, de la prolifération à la mort des cellules (Lu and Means, 1993; Orrenius et al., 2003; Szent-Györgyi, 1975). Le Ca^{2+} joue également un rôle fondamental dans le déclenchement de l'exocytose des neurotransmetteurs contenus dans les vésicules synaptiques au niveau des terminaisons présynaptiques, et dans l'induction de la plasticité synaptique au niveau post-synaptique (Malenka et al., 1989; Pang and Südhof, 2010). Au niveau des sous-compartiments cellulaires comme le noyau, le Ca^{2+} peut réguler la transcription des gènes (Puri, 2020).

1. Utilisation d'indicateur calcique synthétique

Parmi les premiers indicateurs de calcium utilisés pour observer la dynamique de la signalisation du Ca^{2+} figurent les photoprotéines bioluminescentes fixant le calcium comme l'aequorine (Mithöfer and Mazars, 2002). Bien que l'aequorine ait permis de fournir des informations précieuses sur la régulation des processus neuronaux dépendants du Ca^{2+} , la difficulté de son utilisation a entraîné la mise au point d'une nouvelle génération d'indicateurs calciques plus sensibles (Tsien, 1980). Ces indicateurs étaient le résultat de l'hybridation de chélateurs hautement sélectifs pour le Ca^{2+} avec un fluorophore. Au fur et à mesure des années, une variété de nouveaux indicateurs de Ca^{2+} avec une large gamme de spectres d'excitation et d'affinités pour le Ca^{2+} ont été découverts (Grienberger and Konnerth, 2012; Lock et al., 2015; Paredes et al., 2008) (Tableau VIII). La nouvelle génération d'indicateurs de Ca^{2+} est largement utilisée dans les neurosciences car ces indicateurs sont relativement faciles d'utilisation. Ils présentent également un large éventail d'affinités avec le Ca^{2+} ce qui est un avantage considérable. Toutefois, l'un des inconvénients majeurs est que la localisation cellulaire des indicateurs de Ca^{2+} ne peut être facilement contrôlée ou spécifiquement ciblée sur une structure cellulaire particulière. En effet, ces indicateurs, une fois injectés au niveau

cellulaire, diffusent entraînant une réduction de la spécificité spatiale et un signal de fond élevé. De plus, ces indicateurs synthétiques peuvent devenir toxiques pour les cellules à des concentrations trop élevées ou lors d'incubation prolongée des cellules pouvant provoquer la mort cellulaire (Cameron et al., 2016). Il est donc difficile de considérer l'utilisation de ces indicateurs synthétiques pour des expérimentations de longue durée.

Tableau VIII : Exemples d'indicateurs calciques synthétiques

Indicateur calcique	Spectre Excitation/Emission (nm)
Indo-1	355/475
Fura-2	363/510
Oregon Green	490/517
Fluo-4	490/517
Cal520	490/525
Rhod-2	552/581
Fura Red	436/650
X-Rhod	580/602

Il existe aussi une classe d'indicateurs ayant une faible affinité pour le Ca^{2+} qui sont utilisés pour mesurer le Ca^{2+} dans des compartiments sous-cellulaires où l'on s'attend à des niveaux relativement élevés de Ca^{2+} intracellulaire (par exemple dans le réticulum endoplasmique) (Blum et al., 2010). Ces indicateurs à faible affinité pour le Ca^{2+} ont été conçus à l'origine pour la détection et la mesure de la dynamique du magnésium d'où leurs noms : Mag-Indo-1, Mag-Fura-2, Mag-Fluo-4, Mag-Fura-Red, etc. (Hollingworth et al., 2009; Paredes et al., 2008).

2. Utilisation d'indicateur calcique génétiquement codé

Un développement technique important dans la mesure de la dynamique calcique a été l'implémentation des indicateurs de Ca^{2+} codés génétiquement, appelés les GECI (*Genetically Encoded Calcium Indicators*), et qui a débuté dans les années 1990. Les GECI peuvent être classés en deux catégories selon le nombre de protéines fluorescentes présentes dans l'indicateur, certains GECI contiennent une seule protéine fluorescente et certains en contiennent deux. Basés sur des protéines

fluorescentes, les GECI nécessitent une excitation externe avec une lumière. La conception des GECI s'appuie sur la fusion moléculaire d'une fraction de protéine de liaison rapide au Ca^{2+} appelée calmoduline ou CaM, d'un peptide de liaison à la CaM dont la séquence est identique à celle du domaine de liaison de la CaM à la chaîne légère de la myosine du muscle squelettique connu sous le nom de M13, et d'une ou deux protéines fluorescentes. La liaison du Ca^{2+} à la CaM favorise le réarrangement conformationnel intramoléculaire de l'ensemble de la structure, entraînant une modulation de l'intensité de fluorescence (Pérez Koldenkova and Nagai, 2013; Tian et al., 2012) (Figure 29). Les GECI offrent des avantages considérables par rapport aux indicateurs calciques synthétiques, notamment la surveillance de l'activité calcique de sous-types cellulaires ciblés et génétiquement définis, la mesure de la dynamique calcique dans des compartiments sous-cellulaires spécifiques, l'imagerie prolongée de plusieurs jours à plusieurs mois, une imagerie multicolore simultanée (Zhong and Schleifenbaum, 2019). Les GECI sont aujourd'hui devenus un outil précieux pour l'observation de l'activité synaptique des neurones, et peuvent être utilisés de manière combinée avec des approches d'excitation lumineuse à l'aide d'outils optogénétiques qui seront développés dans une autre partie (Akerboom et al., 2013).

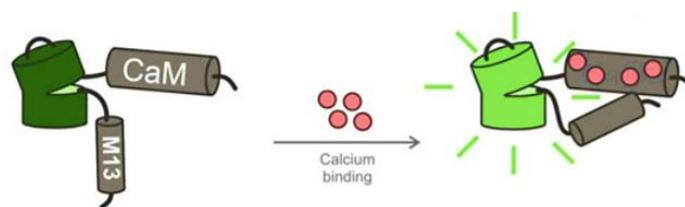


Figure 29. Structure et fonctionnement des indicateurs calciques génétiquement codés (Mollinedo-Gajate et al., 2019)

La liaison du Ca^{2+} provoque des changements de conformation au niveau du complexe calmoduline-M13, ce qui induit des modifications de la fluorescence.

Les principaux GECI sont les GCaMP (*Green fluorescent protein (GFP)-Calmodulin fusion Protein*) faisant partie de la famille des mono-fluorophores. L'une des versions la plus récemment développée est la GCaMP6 qui possède une grande ultra-sensibilité à la dynamique du Ca^{2+} (Chen et al., 2013). La GCaMP6 se divise en trois types : GCaMP-6s, 6m, 6f (pour les cinétiques lente, moyenne et rapide, respectivement). Ces trois types de GCaMP6 ont des cinétiques plus performantes que leur version précédente, la GCaMP5, au niveau de l'intensité de fluorescence et du rapport signal/bruit (Akerboom et al., 2012; Ding et al., 2014). La GCaMP6f est aujourd'hui l'un des

indicateurs ayant la cinétique de réponse au Ca^{2+} la plus rapide, ce qui est intéressant pour la surveillance de cellules ayant des activités synaptiques rapides, mais aussi pour observer la transmission rapide entre des synapses sans aucune perte de signal (Podor et al., 2015).

De plus, pour l'expression à long terme, il est nécessaire d'induire l'expression des GECI dans les cellules par infection virale ou transgénèse. Il existe plusieurs vecteurs viraux à disposition, dont l'efficacité de transduction et la toxicité doivent être pris en considération. L'utilisation de promoteurs spécifiques aux cibles cellulaires augmente la sélectivité de la transgénèse dans les cellules d'intérêt sans affecter les autres populations cellulaires, tels que les promoteurs constitutifs CMV (*human Cytomegalovirus*) et CAG (*CMV early enhancer/chicken β -actin*) (Damdindorj et al., 2014), hSyn1 (*human Synapsin 1*) (Kügler et al., 2003) ou encore CaMKII (*Calcium/Calmodulin-dependent Kinase II*) (Mima et al., 2001) pour cibler les cellules neuronales. Par ailleurs, un phénomène de cytomorbidité peut être induit par les GCaMP et qui se traduit par l'accumulation d'indicateur calcique dans le noyau de la cellule. Ce phénomène peut être causé par une instabilité du niveau d'expression des GCaMP dans les cellules du fait d'une variation de température lors des expérimentations qui se font normalement en conditions physiologiques optimales (37°C, 5% CO_2), ou bien une exposition trop prolongée des cellules avec les GCaMP (Borghuis et al., 2011; Weitz et al., 2013).

C. Contrôle de l'activité synaptique via les outils optogénétiques

Apparues dans le courant des années 2000, les techniques de neuromodulation optogénétique ont considérablement augmenté la compréhension du fonctionnement du système nerveux et de la neurotransmission par le biais de stimulations lumineuses, pour l'excitation et l'inhibition de populations neuronales ciblées génétiquement, avec une grande spécificité et une forte résolution spatio-temporelle (Boyden et al., 2005). L'optogénétique s'est étendue à l'étude d'autres cellules excitables en plus des différents sous-types de neurones (Mallory et al., 2015; Osaki et al., 2018; Steinbeck et al., 2015; Tian et al., 2018) telles que les cardiomyocytes (Ambrosi and Entcheva, 2014; Jia et al., 2011) ou les cellules des muscles squelettiques (Santhanam et al., 2018; Seville et al., 2017; Vila et al., 2019), et n'a été utilisée que modérément pour contrôler le potentiel de membrane dans des cellules non excitables (Chapotte-Baldacci et al., 2020).

L'optogénétique est une méthode génétique non invasive qui implique l'utilisation de la lumière pour contrôler l'activité des cellules avec une grande précision temporelle et spatiale. En ciblant sélectivement des types de cellules individuelles et en activant ou désactivant leur activité sur

une échelle de temps de quelques millisecondes, l'optogénétique offre un degré élevé de spécificité et de contrôle de l'activité du réseau cellulaire. L'optogénétique nécessite l'utilisation de protéines activées par la lumière, les opsines microbiennes : le canal-rhodopsine 2 (ChR2) pour l'activation et l'halorhodopsine (NpHR) pour la désactivation des cellules (Artamonov et al., 2014; Mohanty and Lakshminarayanan, 2015; Montagni et al., 2019; Nagel et al., 2003). Le ChR2 est un canal cationique activé par la lumière bleue (470 nm) qui est utilisé pour dépolariser les cellules et générer un potentiel d'action. La NpHR, quant à elle, est une pompe à chlorure activée par la lumière jaune (580 nm), ce qui entraîne une hyperpolarisation des cellules pour en éteindre leur signal (Figure 30). Les opsines n'étant pas naturellement fluorescentes, il est nécessaire de disposer de construction virale codant pour une opsine d'intérêt fusionnée avec une protéine fluorescente comme la GFP, ce qui permet de visualiser l'expression des opsines dans les cellules.

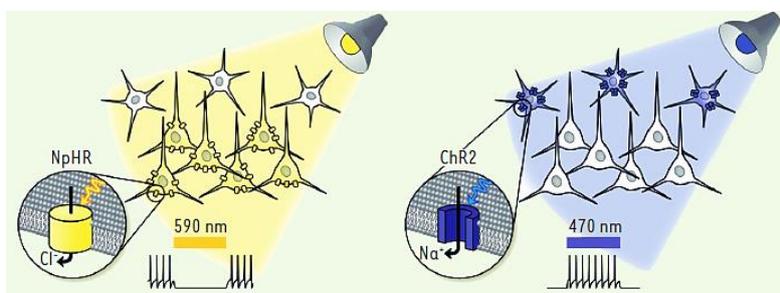


Figure 30. Stratégies optogénétiques (Vandecasteele et al., 2015)

Il existe deux stratégies : inhiber les cellules par expression spécifique de pompes hyperpolarisantes (NpHR) ou exciter les cellules par expression d'outils dépolarisants (ChR2).

Des progrès dans la mise au point de nouveaux variants des opsines, tels que ReaChR (*Red-activatable Channelrhodopsin*) et ChrimsonR, ont permis d'étendre le spectre de stimulation vers d'autres longueurs d'onde dont le rouge (590-630 nm) et se sont révélés non toxiques pour les cellules et avec une meilleure sensibilité (Garita-Hernandez et al., 2018; Klapoetke et al., 2014; Lin et al., 2013; Sengupta et al., 2016) (Figure 31). Le ReaChR est excité de manière optimale par une lumière orange à rouge (590-630 nm), et améliore le trafic membranaire grâce à des courants plus élevés et une cinétique plus rapide par rapport aux autres variants. Il est aujourd'hui l'un des variants excitables par la lumière rouge les plus utilisés.

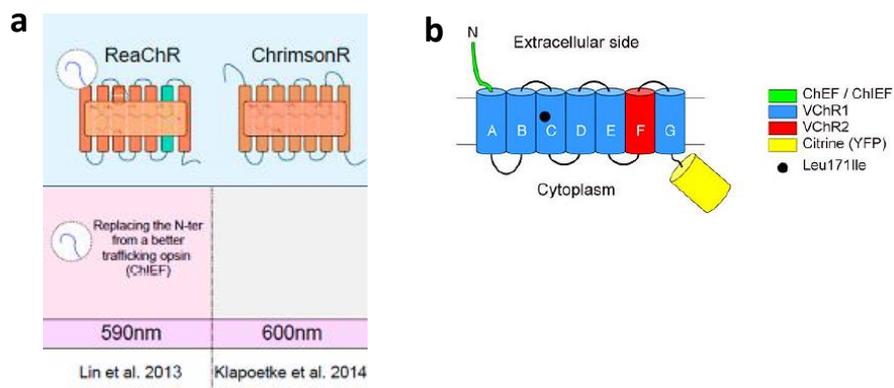


Figure 31. Nouveaux variants du ChR2 sensibles à la lumière rouge (Garita-Hernandez et al., 2018; Lin et al., 2013)

(a) Les variants ReaChR et ChrimsonR sont excités respectivement à des longueurs d'onde de 590 nm et 600 nm. (b) Exemple de la structure du ReaChR qui comporte entre autres des domaines transmembranaires et une protéine fluorescente, la citrine.

L'optogénétique est un outil qui est de plus en plus utilisé à la fois dans des recherches mécanistiques ou dans des études visant à identifier des composés potentiellement thérapeutiques. Ainsi, une étude récente sur les défauts neuromusculaires dans la sclérose latérale amyotrophique a mis en évidence le potentiel thérapeutique de certains composés sur la récupération fonctionnelle des cellules musculaires en mesurant les contractions (Osaki et al., 2020). Dans cette étude, un modèle 3D de JNM humaine dérivé de CSPi a été établi, avec des neurones moteurs portant un ChR2. Le contrôle optogénétique généré sur les neurones moteurs par leur activation à la lumière bleue a provoqué la contraction des cellules musculaires en réponse à la stimulation des neurones moteurs. La force de contraction musculaire est une propriété intéressante pour quantifier l'effet de composées à la suite du contrôle par optogénétique de tout un système. Par ailleurs, grâce aux progrès réalisés sur les indicateurs calciques notamment les GCaMP, l'utilisation simultanée de l'optogénétique et de l'enregistrement basé sur la fluorescence du Ca^{2+} , dans des systèmes de coculture par exemple, offre la possibilité de contrôler l'une des composantes du système et d'en observer les effets sur l'autre du fait des connexions synaptiques établies entre les deux composantes. Dans des systèmes de modélisation pathologique, l'optogénétique peut permettre de suractiver un réseau synaptique ou bien de le sous-activer afin de mimer des pathologies comme l'épilepsie où le réseau neuronal est anormalement suractivé (Cela and Sjöström, 2019; Walker and Kullmann, 2020), ou les maladies neurodégénératives dont la perte des neurones et de leurs projections réduisent l'activité cérébrale (Ordaz et al., 2017; Xie et al., 2020). Les propriétés des outils

optogénétiques et leurs nombreux avantages, ouvrent ainsi de nouvelles perspectives thérapeutiques. En effet, la neuromodulation optogénétique est un outil de choix pour l'étude de la physiopathologie de nombreuses pathologies types neurologiques, neuropsychiatriques et neuromusculaires, et pourrait ainsi accélérer la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Chapitre 4 : Synapse neuro-neuronale

Dans le cadre du projet de thèse, nous nous sommes également intéressés aux synapses neuro-neuronales qui représentent de potentielles cibles des BoNT. En vue du large potentiel thérapeutique des BoNT, nous avons choisi de nous focaliser sur le cortex cérébral et d'étudier spécifiquement un système synaptique cortico-cortical. Le réseau synaptique cortico-cortical a la particularité de se synchroniser, ce qui facilite les études fonctionnelles et augmente la capacité d'étudier le système à haut débit. De plus, nous avons démontré dans une précédente étude que les neurones corticaux étaient sensibles au BoNT, avec une sensibilité moindre que les neurones moteurs mais bien présente (Duchesne de Lamotte et al., 2021; Nicoleau et al., 2018a).

I. Développement du cortex cérébral

Le cortex cérébral des mammifères est organisé en six couches contenant chacune une centaine de sous-types de neurones caractérisés par des morphologies uniques, des modèles de projection spécifiques et des profils d'expression génétique différents (Molyneaux et al., 2007). Les six couches, notées I à VI de la surface vers la profondeur, se distinguent dans un ordre bien précis (Douglas and Martin, 2004) (Figure 32) :

- Couche I ou couche moléculaire : elle est pauvre en cellules nerveuses, et est principalement constituée de cellules gliales et de fibres nerveuses horizontales de Cajal. Ces dernières ont un trajet parallèle à la surface corticale et leurs axones font synapses avec les cellules pyramidales.
- Couche II ou couche granulaire externe : elle est principalement constituée de petits neurones non pyramidaux. Elle reçoit des afférences cortico-corticales.
- Couche III ou couche pyramidale externe : elle contient la majorité des neurones pyramidaux, ainsi que des interneurons et des connexions cortico-corticales efférentes. Les axones des neurones de cette couche forment des connexions intra-hémisphériques et interhémisphériques.
- Couche IV ou couche granulaire interne : elle contient des petits neurones non pyramidaux représentés principalement par des cellules étoilées. Elle compte aussi des afférences extérieures au cortex.

- Couche V ou couche pyramidale interne : elle contient essentiellement des neurones pyramidaux de grande taille dont les dendrites projettent soit dans la couche I, soit dans la couche IV. Quant aux axones, ils projettent à distance vers des structures comme par exemple le striatum, le tronc cérébral, la moelle épinière.
- Couche VI ou couche polymorphe : elle est la source principale des neurones qui projettent vers le thalamus.

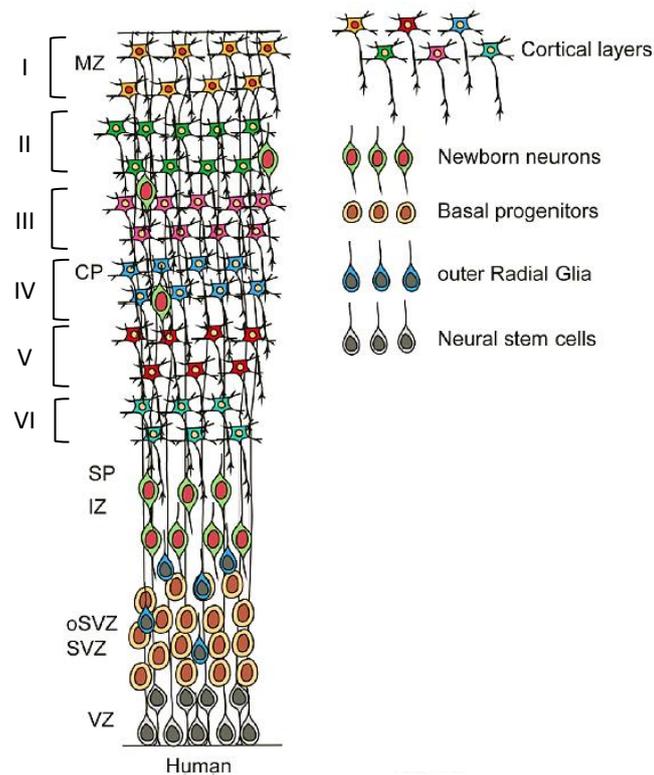


Figure 32. Organisation des couches corticales dans le cortex cérébral humain (Mukhtar and Taylor, 2018)

Chacune des couches corticales possède des neurones excitateurs et inhibiteurs : la majorité des neurones sont excitateurs et synthétisent le glutamate, et 15 à 20 % sont des interneurones inhibiteurs synthétisant le GABA (acide γ -aminobutyrique) (Beaulieu, 1993; Rubenstein, 2011). Les neurones excitateurs ont majoritairement une morphologie pyramidale, présentent une activité électrique active et régulière en réponse à un apport de courant constant, et projettent hors du cortex. Quant aux interneurones inhibiteurs, ils sont plus diversifiés morphologiquement et électrophysiologiquement, ils ont une fonction inhibitrice essentielle dans la mise en place des circuits neuronaux fonctionnels, et ne projettent pas leurs axones en dehors du cortex (Connors and

Gutnick, 1990). Au sein du cortex, on retrouve également différents types d'astrocytes, non excitables mais présentant toutefois une signalisation calcique transmise d'une cellule à une autre par l'intermédiaire de jonctions communicantes (Scemes and Giaume, 2006).

La neurogenèse du cortex, ou corticogenèse, débute par une première période de 1 à 2 mois chez l'Homme, où le neuroépithélium a un comportement essentiellement prolifératif lui permettant d'accroître la surface du télencéphale à l'origine du futur cortex. Au cours de cette période, les cellules neuroépithéliales se divisent de façon symétrique, ce qui entraîne la production d'un groupe de progéniteurs corticaux qui se transforment ensuite en cellules gliales radiales ventriculaires (vRGC). Les vRGC entreprennent une division cellulaire asymétrique pour générer une autre vRGC et un neurone de projection naissant. Le neurone migre ensuite radialement de la zone ventriculaire (VZ) le long du processus basal d'un RGC dans la plaque corticale (CP). C'est donc un ensemble de premiers neurones hétérogènes qui naissent, migrent et s'assemblent pour former la préplaque, considérée comme une ébauche du cortex et qui facilite les migrations des cellules et l'établissement des projections axonales. La préplaque se divisera plus tardivement en zone marginale (MZ) et sous-plaque (SP). Au cours de la corticogenèse, plusieurs sous-types de neurones sont générés par les divisions asymétriques successives des RGC. Les neurones de projection apparaissant à la naissance rejoignent les couches corticales profondes (couches V et VI), et les neurones de projection apparaissant plus tard rejoignent les couches corticales plus tardivement dans le processus de corticogenèse. En outre, certaines cellules générées par la division des RGC deviennent, soit des progéniteurs intermédiaires (IP), soit des cellules gliales radiales externes (oRGC) au niveau de la zone sous-ventriculaire (SVZ). Après ces différents stades, les RGC deviennent gliogènes et peuvent générer des astrocytes. Deux formes de migration neuronale, la migration tangentielle et la migration radiale, entraînent respectivement, la naissance des neurones GABAergiques inhibiteurs et des neurones glutamatergiques excitateurs (Gilmore and Herrup, 1997; Molnár et al., 2019; Mukhtar and Taylor, 2018) (Figure 33).

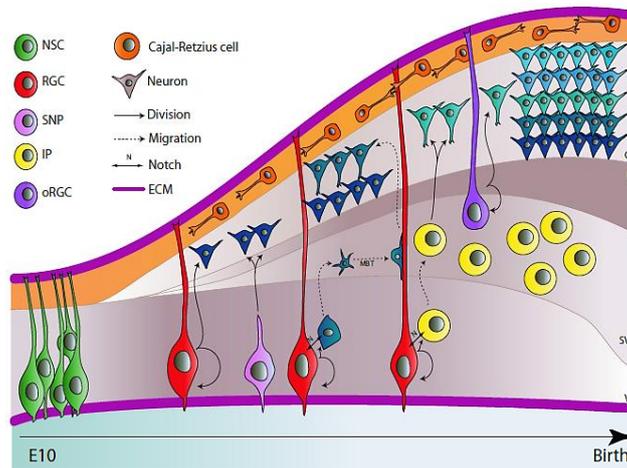


Figure 33. Neurogenèse corticale (Agirman et al., 2017)

Différents morphogènes et voies de signalisation ont été identifiés et sont impliqués dans le développement cortical, tels que les voies Notch, Wnt et Shh, et les facteurs comme le FGF, le TGF- β et le RA (Agirman et al., 2017; Lehtinen et al., 2011). Dans le cortex en développement, les récepteurs Notch1/3 sont exprimés par des RGC et par des neurones voisins ou par les IP. La voie de signalisation Notch est activée dans les RGC à la suite d'un contact de cellule à cellule avec des cellules avoisinantes, et est essentielle pour le développement des cellules progénitrices (Patten, 2006). La voie de signalisation Wnt joue un rôle majeur dans le développement du cerveau, et notamment un rôle central dans la spécification du télencéphale à l'origine du cortex cérébral (Backman et al., 2005). Le facteur Shh est principalement sécrété par le télencéphale ventral, et est également produit par les cellules de Cajal au niveau de la ZM du cortex cérébral et par les interneurones qui ont migré vers la CP (Huang et al., 2010; Komada et al., 2008). Shh contribue aussi à la génération d'oligodendrocytes et d'interneurones GABAergiques, qui envahissent ensuite la CP par migration tangentielle (Xu et al., 2010). Les facteurs de croissance FGF et TGF- β favorisent la formation, la différenciation et l'auto-renouvellement des RGC, et par conséquent le contrôle de la croissance normale du cerveau (Kang et al., 2009; Li et al., 1998; Sahara and O'Leary, 2009).

II. Mécanisme de la transmission glutamatergique

Le glutamate est le principal neurotransmetteur exciteur du système nerveux central et il nécessite l'intervention de neurones et de cellules gliales pour déclencher sa fonction de neurotransmetteur : c'est la synapse tripartite. Le glutamate est présent à des concentrations élevées dans le système nerveux central. Ces concentrations élevées exigent la mise en place de processus

de régulation précis. Le glutamate neuronal est synthétisé de novo à partir du glucose et de la glutamine fournis par les cellules gliales. Le glutamate est ensuite conditionné dans des vésicules synaptiques par les vGluT (*vesicular Glutamate Transporter*). Les protéines SNARE assurent ensuite leur rôle dans la médiation de l'interaction et de la fusion des vésicules avec la membrane présynaptique du neurone (Rizo and Rosenmund, 2008). Une fois la fusion réalisée, les vésicules libèrent leur contenu et le glutamate se retrouve dans la fente synaptique (Südhof and Rizo, 2011). Le glutamate se lie par la suite aux récepteurs NMDA (*N-methyl-D-aspartate*) et AMPA (*α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*), deux récepteurs dits ionotropes, et également aux récepteurs métabotropiques mGluR (*metabotropic Glutamate Receptor*) au niveau des membranes des neurones et des cellules gliales (Martínez-Lozada and Ortega, 2015; Siddoway et al., 2011). Le nombre et la stabilité de ces récepteurs au niveau de la membrane synaptique est un facteur significatif quant à l'efficacité de la transmission synaptique excitatrice. Lors de la liaison du glutamate aux récepteurs, une cascade de réponses se déclenche, un afflux de sodium provoquant la dépolarisation des membranes, l'activation de cascades de messagers intracellulaires et la modulation de la synthèse locale des protéines. Le glutamate fini par être éliminé de la fente synaptique par les transporteurs EAAT (*Excitatory Amino Acid Transporter*) situés sur les cellules gliales voisines (EAAT1/2) et, dans une moindre mesure, sur les neurones (EAAT3 et EAAT4) (O'Shea, 2002). Dans la cellule gliale, le glutamate est converti en glutamine par la glutamine synthétase, pour ensuite être recaptée par le neurone présynaptique où elle sera hydrolysée en glutamate par la glutaminase (Erecinska, 1990) (Figure 34).

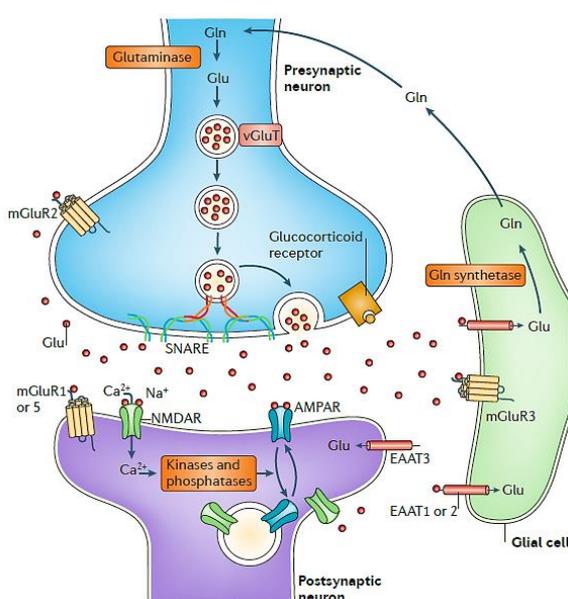


Figure 34. Transmission synaptique glutamatergique
(Popoli et al., 2012)

Le glutamate (Glu) libéré par la terminaison synaptique se diffuse à travers la fente synaptique, se lie et ouvre les récepteurs spécifiques du glutamate (AMPA, NMDAR et mGluR), ce qui entraîne une dépolarisation de la membrane.

III. Mise en place d'un réseau cortical actif

A. Méthodes de différenciation corticale des cellules souches neurales

Un certain nombre de modèles de différenciation de neurones corticaux excitateurs à partir de CSPi ont été développés (Tableau IX). L'utilisation de morphogènes activant des voies de signalisation particulières est essentielle pour induire spécifiquement la différenciation des neurones glutamatergiques. Parmi ces facteurs, on retrouve ceux impliqués dans la double inhibition de la voie SMAD dont le SB431542 associé à la dorsomorphine ou au LDN193189, qui influencent l'induction neurale. Ensuite, des facteurs comme le FGF sont investis dans la phase d'expansion des progéniteurs. Puis la différenciation et la spécification en neurones corticaux s'établissent grâce à des facteurs de croissance dont le BDNF, le GDNF et l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), également des petites molécules et des composés (DAPT, AMPc, VPA ou acide valproïque) qui aide à l'induction et à la différenciation des progéniteurs corticaux. La différenciation efficace et dirigée des CSP en progéniteurs du télencéphale, y compris les progéniteurs corticaux, a été mise en évidence grâce à deux méthodologies. La première méthode a consisté à cultiver les CSE à faible densité en condition adhérente dans un milieu dépourvu de sérum et de morphogène, mais contenant de l'insuline afin de permettre la survie des cellules. Cette méthode a conduit à la génération d'une population de cellules principalement progénitrices du télencéphale (Gaspard et al., 2008, 2009). La seconde méthode a démontré que les CSE pouvaient également être cultivées dans des conditions non adhérentes, cette fois-ci en présence d'inhibiteurs de morphogènes impliqués dans la structuration du télencéphale, entraînant la croissance et la structuration de corps cellulaires neuraux présentant une identité télencéphalique ou corticale (Eiraku et al., 2008). Parmi ces inhibiteurs on compte la cyclopamine, un alcaloïde naturel qui inhibe les voies de Shh au cours de l'induction neurale et donc favorise la dérivation des progéniteurs corticaux en neurones glutamatergiques des différentes couches corticales, dont la génération respecte l'ordre d'apparition des couches corticales observé au cours de la corticogenèse (Cao et al., 2017). En effet, l'activation de la voie Shh peut entraîner la dérivation des progéniteurs corticaux en diverses populations de neurones GABAergiques, y compris les interneurons GABAergiques (Maroof et al., 2010).

A la suite de ces travaux, des équipes ont cherché à développer des protocoles permettant d'obtenir des catégories plus spécifiques de neurones corticaux. En effet, les neurones corticaux localisés dans les différentes couches du cortex et leurs projections vers des structures essentielles

sont impliqués dans une diversité de pathologies. Il est donc important de comprendre les modes de projection des neurones des différentes couches corticales et d'identifier les facteurs moléculaires impliqués dans la spécification des modèles de projection de chacune des couches (Baker et al., 2018; Leone et al., 2008; Tomassy et al., 2010). Pour illustrer, les neurones situés dans les couches corticales profondes se projettent principalement vers des cibles sous-corticales comme le thalamus (couche VI), la moelle épinière, le mésencéphale ou le striatum (couche V), tandis que les neurones des couches corticales superficielles II et III se connectent principalement à d'autres zones corticales (Figure 35).

Tableau IX : Exemples de protocoles d'induction de neurones corticaux à partir de CSPi

Référence	Méthode	Facteurs différenciation et maturation	Efficacité
(Shi et al., 2012b)	Rosettes	FGF2, Noggin, SB431542, Dorsomorphine, Glutamine	GLUT
(Mariani et al., 2012)	SFEBq	FGF2, DKK1, NEAA, SB431542, BMPR1A, Glutamine	80% GLUT / 10% GABA
(Boissart et al., 2013)	Rosettes	FGF2, EGF, BDNF, GDNF	70% GLUT / 10% GABA
(Espuny-Camacho et al., 2013, 2017)	EB	Noggin, Glutamine	60% GLUT / 10% GABA
(Mehta et al., 2018)	Rosettes	FGF2, SB431542, LDN193189, Insuline, Glutamine	30% neurones corticaux
(Hyvärinen et al., 2019)	EB	FGF2, RA, SB431542, LDN193189, Insuline, BDNF, GDNF, AMPc, AA	70% GLUT / 10% GABA
(Gribaudo et al., 2019)	Rosettes	FGF2, SB431542, LDN193189, XAV939, BDNF, EGF, AMPc, VPA, DAPT	75% GLUT / 20% GABA
(Hedegaard et al., 2020a)	Rosettes	FGF2, SB431542, Dorsomorphine, Insuline, Glutamine	70% Astrocytes / 10% neurones corticaux

AA : acide ascorbique ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; BDNF : *brain derived neurotrophic factor* ; BMPR1A : *bone morphogenic protein receptor 1A* ; CSPi : cellules souches pluripotentes induites ; DKK1 : *dickkopf-related protein 1* ; EB : corps embryonnaires ; EGF : *epidermal growth factor* ; FGF2 : *fibroblast growth factor 2* ; GABA : neurones GABAergiques ; GDNF : *glial cell line-derived neurotrophic factor* ; GLUT : neurones glutamatergiques ; NEAA : *non-essential amino acid* ; RA : acide rétinoïque ; SFEBq : *quick serum free culture of embryoid bodies* ; VPA : acide valproïque

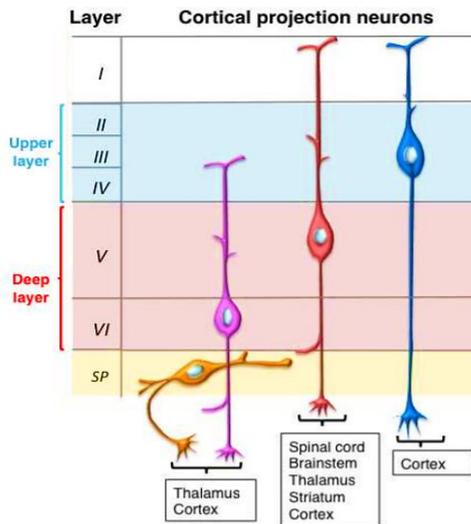


Figure 35. Spécification des sous-types de projection des neurones corticaux (MuhChyi et al., 2013)

Après la formation des différentes couches du cortex et de l'acquisition des propriétés neuronales au niveau des couches, les neurones corticaux en cours de spécification confèrent leur identité de projection. Chaque neurone cortical projette son axone vers une cible spécifique, directement au sein du cortex ou bien vers d'autres structures.

Les modèles 2D sont les plus couramment générés, ils récapitulent les aspects clés de la corticogenèse et sont utiles pour étudier le fonctionnement normal ou pathologique des neurones corticaux, mais ils restent cependant réductionnistes puisqu'ils ne permettent pas de générer les six couches corticales. Un effort sur le développement de modèles 3D a été fait dans le but de disposer de modèles pouvant récapituler l'organisation *in vivo* des progéniteurs et des neurones corticaux, et offrant un outil pertinent pour l'étude de la structuration spatiale et de la formation cyto-architecturale du cortex (van den Aemele et al., 2014; Varrault et al., 2019) (Figure 36). D'autre part, alors que les neurones des couches corticales profondes et superficielles *in vivo* représentent chacun environ la moitié du cortex, les neurones pyramidaux générés *in vitro* par le biais des protocoles de différenciation existants, sont fortement orientés vers une identité de couche plus qu'une autre. Cette observation suggère que des facteurs extrinsèques provenant des structures alentours au cortex et n'étant pas reproduits *in vitro*, seraient nécessaires à la génération des neurones de chaque couche en proportion équivalente (Tiberi et al., 2012).

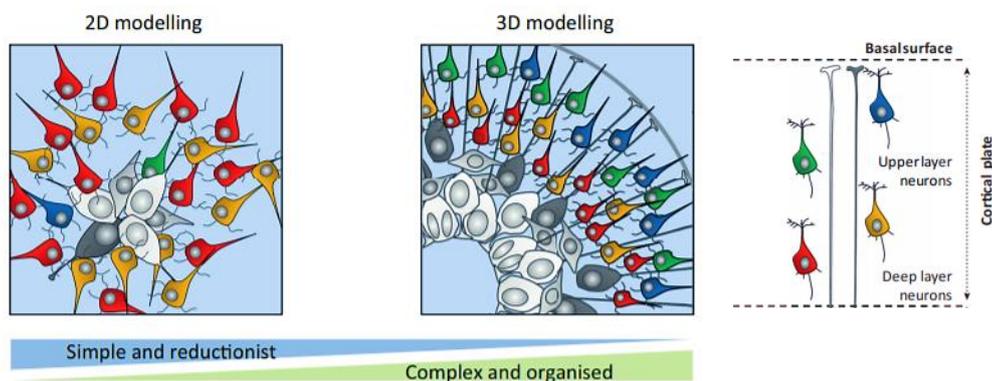


Figure 36. Modélisation de la corticogenèse *in vitro* 2D et 3D (van den Aemele et al., 2014)

B. Synapse corticale, outil d'étude des circuits cérébraux dans les troubles neurologiques

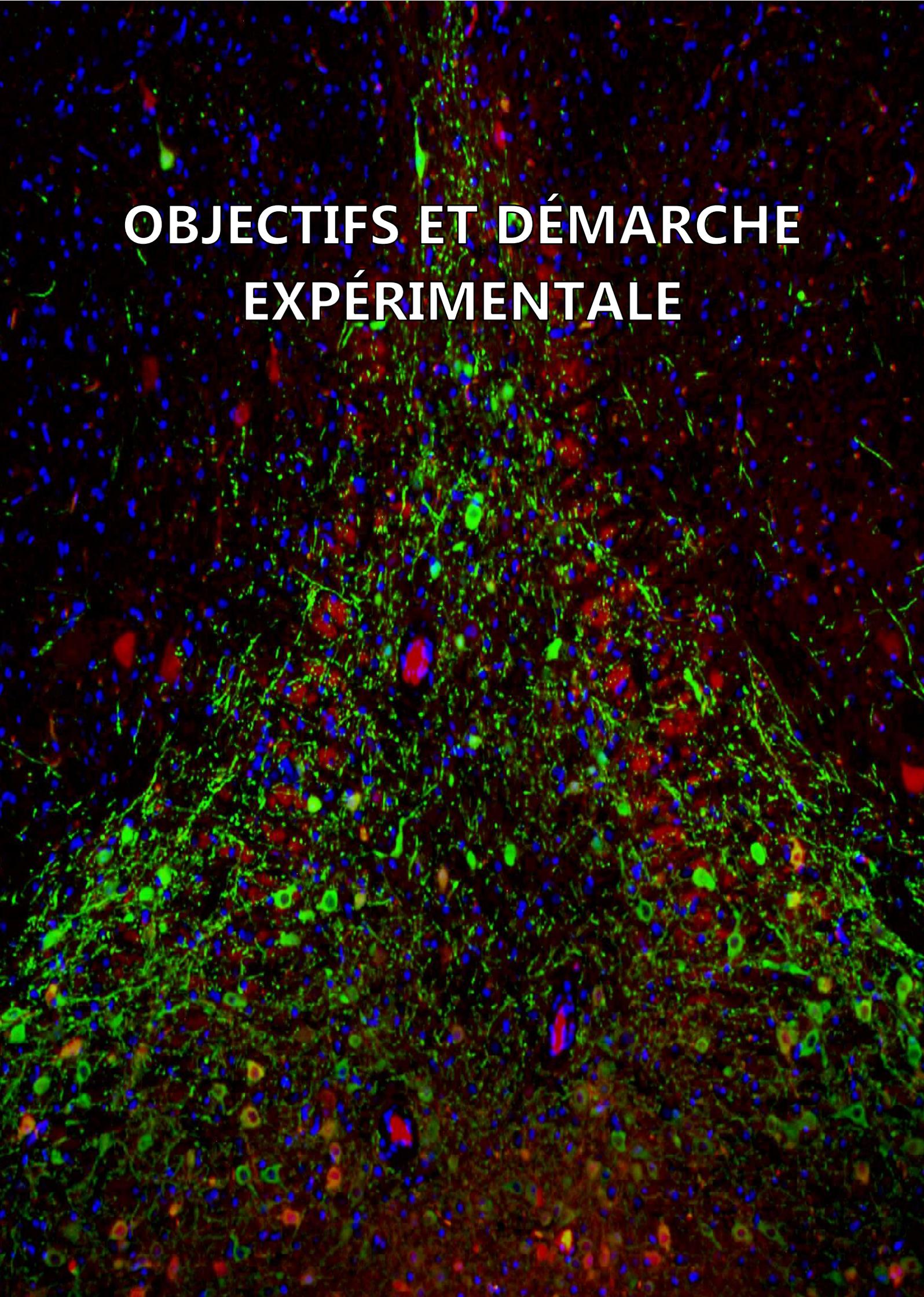
Les récents développements dans le domaine des CSP ont offert des perspectives nouvelles pour la compréhension d'une variété de pathologies, leurs analyses moléculaires et le développement de médicaments. Les troubles du développement neurologique, tels que la schizophrénie ou les troubles du spectre autistique, sont parmi les applications pour lesquelles l'utilisation des CSPi humaines est prometteuse. En effet, ces deux troubles sont difficilement distingués du fait de leurs nombreuses similarités dysfonctionnelles (Stock et al., 2021).

Les troubles du développement neurologique se traduisent par des déficits de développement précoce, tels que la réduction des connectivités neuronales ou une synaptogénèse altérée, qui peuvent être reproduits *in vitro* dans des neurones dérivés de CSPi (Nicholas et al., 2013). C'est le cas pour la modélisation de la schizophrénie, où les neurones corticaux dérivés de CSPi de patients ont montré une réduction de la connectivité neuronale, de la croissance des neurites et des marqueurs synaptiques (Brennand et al., 2011; Funk et al., 2017). De la même façon, les troubles du spectre autistique sont caractérisés par des structures dendritiques anormales avec des épines morphologiquement altérées, liées à la dérégulation des connectivités neuronales. Dans les neurones dérivés de CSPi de patients atteints de troubles autistiques, la diminution du nombre de neurites et de leur longueur a été observée (Grunwald et al., 2019).

Les troubles neurologiques sont également étroitement liés à une activité déficiente du réseau neuronal. L'utilisation des CSPi issus directement des patients permet de conserver *in vitro* cette déficience fonctionnelle qui a été mesurée grâce au MEA (DeRosa et al., 2018). Plusieurs modèles dérivés de CSPi avec des mutations ont été établis pour les deux troubles étudiés, ce qui a permis de mettre en évidence l'implication de la mutation SHANK3 dans la diminution de la transmission synaptique dans les deux troubles (Huang et al., 2019). Une autre mesure de la fonctionnalité, celle de la signalisation calcique, a cette fois-ci révélé des différences entre les deux troubles. En effet, les troubles autistiques et la schizophrénie peuvent être distingués par des modèles d'activité calcique distincts. L'amplitude des oscillations calciques a été réduite dans les neurones dérivés de CSPi de patients atteints de troubles autistiques (Marchetto et al., 2017). Dans les neurones dérivés de CSPi de patients atteints de schizophrénie, c'est la fréquence de ces oscillations qui a été réduite (Grunwald et al., 2019). Les tests fonctionnels peuvent ainsi permettre

de distinguer des phénotypes de schizophrénie et de troubles du spectre autistique dans des neurones dérivés de CSPi humaines.

Pour terminer, les CSPi humaines représentent une base fiable pour la génération de types cellulaires pertinents pour diverses pathologies impliquants les neurones corticaux, afin d'en explorer les mécanismes sous-jacents qui affectent l'activité neuronale, la synchronisation et la connectivité fonctionnelle synaptique en relation avec la déficience cognitive, sensorielle et motrice. Grâce aux nombreux progrès réalisés dans les méthodes de différenciation des CSPi en neurones corticaux, il est désormais possible de récapituler *in vitro* la progression cellulaire amenant à la déficience. Cette capacité permet ainsi aux scientifiques de découvrir de nouveaux phénotypes de maladies dans l'espoir d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

A fluorescence microscopy image of a neural network. The image shows a dense field of neurons with green and red staining, and blue staining highlighting nuclei. The neurons are interconnected, forming a complex network. The background is dark, making the colored cells stand out.

OBJECTIFS ET DÉMARCHE EXPÉRIMENTALE

Les tests couramment utilisés pour mesurer l'activité des neurotoxines botuliques, bien que fournissant des informations précieuses sur leur fonctionnement et leur puissance, présentent d'importantes limitations qui restreignent leur utilisation dues (i) à la faible sensibilité et la subjectivité des modèles de rongeurs, (ii) aux différences inter-espèces observées entre les séquences de certains récepteurs essentiels à l'intoxication des BoNT, (iii) au faible débit apporté par les systèmes *in vivo* utilisés, et (iv) au manque d'étude de fonctionnalité et l'absence de lecture universelle des tests *in vitro* réduisant les possibilités de comparaison des différents sérotypes de BoNT. Toutes ces limitations freinent aujourd'hui l'utilisation de la neurotoxine pour de nombreuses indications pathologiques.

Dans le but de surmonter ces limites et d'assurer une base biologique et technologique solide et pertinente avec une valeur translationnelle pour le développement de nouvelles thérapies à base de BoNT, nous avons cherché à développer de nouveaux systèmes *in vitro* humains permettant d'étudier l'activité des BoNT sur la transmission synaptique. Les tests ainsi développés au cours de ce doctorat ont cependant dû répondre à plusieurs exigences.

Tout d'abord, les tests devaient être basés sur l'utilisation des cellules humaines présentant un phénotype sensible et pertinent pour l'activité des BoNT. Deux modèles ont été générés afin d'étudier l'activité des neurotoxines sur la transmission synaptique : i) un système synaptique mimant la jonction neuromusculaire *in vitro*, étant la principale cible des BoNT *in vivo*, ii) un système synaptique mimant le réseau cortico-cortical pouvant lui aussi être atteint par les BoNT. Le premier système sera largement présenté dans la partie consacrée aux travaux de recherche, quant au second système il fera l'objet d'une discussion ouverte concernant les perspectives d'applications des BoNT. Pour générer les ressources biologiques nécessaires à la mise en place de ces systèmes, une première étape cruciale de mise au point des conditions de culture et surtout de coculture a été réalisée, pour ensuite s'assurer de la sensibilité des systèmes à une BoNT de référence de sérotype clé, la neurotoxine recombinante A (rBoNT/A) produite par le laboratoire IPSEN. Pour répondre à cet objectif, nous nous sommes basés sur les travaux réalisés auparavant au laboratoire IPSEN, qui ont permis de mettre en évidence la sensibilité des neurones dérivés de CSPi humaines (neurones commerciaux moteurs, glutamatergiques, GABAergiques et périphériques) aux BoNT, faisant de ces neurones des modèles de choix pour l'étude des BoNT (Duchesne de Lamotte et al., 2021; Nicoleau et al., 2018a, 2018b).

Ensuite, les différents modèles cellulaires pertinents pour le projet (neurones moteurs,

neurones corticaux et cellules musculaires) devaient être produits en nombre et en qualité suffisants à partir notamment de CSPi humaines préalablement amplifiées à grande échelle et ayant passé le contrôle qualité sans accroc, dont les propriétés fondamentales sont l'auto-renouvellement et la pluripotence. Fort de l'expérience des équipes basées au laboratoire I-Stem et des technologies déjà en place, des modèles cellulaires de qualité ont pu être générés de façon robuste à partir de protocoles déjà établis pour les neurones moteurs et les neurones corticaux dérivés de CSPi humaines (Figure 37). Les cellules musculaires quant à elles, ont été récupérées à l'Institut de Myologie, puis amplifiées et contrôlées au laboratoire I-Stem.

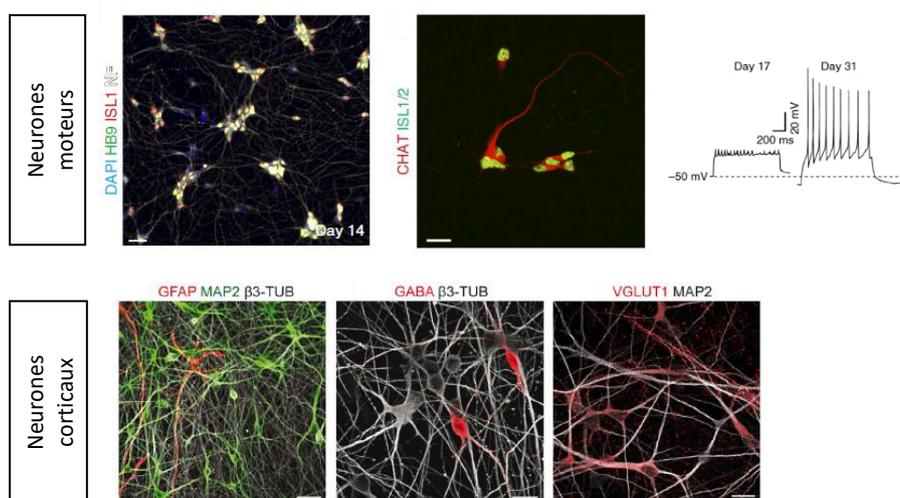


Figure 37. Protocoles de différenciation des neurones moteurs et corticaux établis au laboratoire I-Stem (Gribaudo et al., 2019; Maury et al., 2015)

Les neurones générés expriment correctement les facteurs neuronaux, phénotypiques et synaptiques propres à leur lignage neuronal. La fonctionnalité de ces neurones a également été établie.

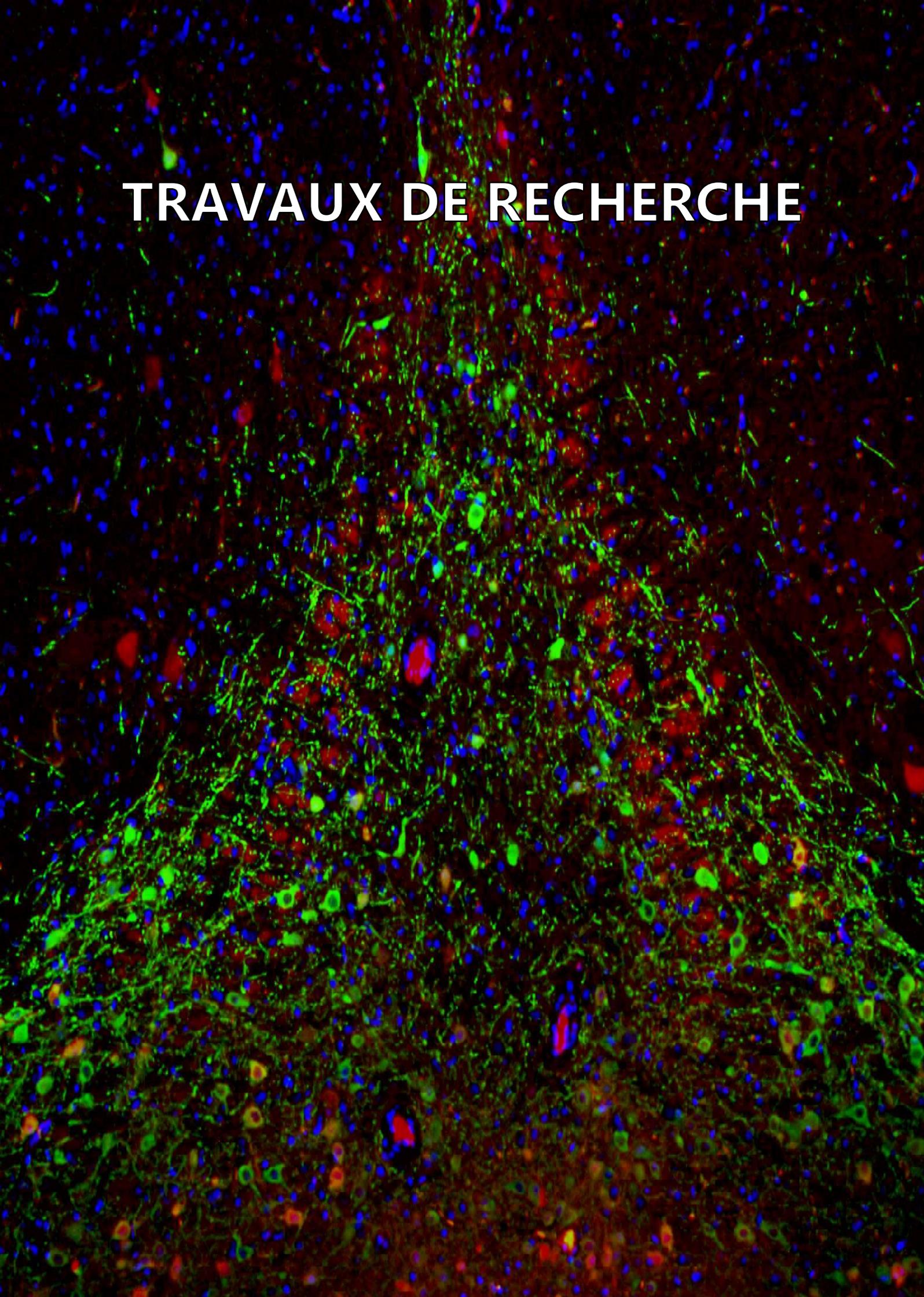
Les tests à développer devaient fournir une lecture fonctionnelle de la communication au niveau de la jonction neuromusculaire et entre les synapses des neurones. C'est grâce à une technologie de neuro-imagerie en direct (imagerie de la signalisation calcique et/ou contrôle optogénétique de l'activation des composants présynaptiques) que la surveillance de l'activité synaptique a pu être réalisée. L'utilisation de l'imagerie classique du calcium pour caractériser l'activité synaptique des systèmes a été la première étape de la mise en place de cette technologie pour confirmer et établir leur sensibilité à la BoNT de référence. L'étape suivante a visé à obtenir un contrôle étendu de la stimulation de la composante présynaptique dans le système de coculture mimant la jonction neuromusculaire en utilisant la technologie optogénétique dans un

système miniaturisé (plaque 96 puits) afin d'affiner la lecture fonctionnelle pouvant être collectée. Enfin, la troisième étape a consisté à appliquer une imagerie fonctionnelle optimisée pour mettre au point un test fonctionnel synaptique sensible à la BoNT pour chacun des systèmes synaptiques générés.

Enfin, les tests devaient également nous permettre d'étudier l'effet de plusieurs sérotypes de BoNT ayant des mécanismes d'action différents sur la transmission synaptique dans des systèmes miniaturisés (plaque 96 puits ou 384 puits) dans un contexte à moyen ou à haut débit grâce aux plateformes technologiques en place et en développement au laboratoire I-Stem.

Le projet de doctorat a donc mené au développement de tests fonctionnels *in vitro* modélisant la connexion synaptique entre des systèmes de jonctions humaines, et d'étudier l'effet des toxines botuliques dans des systèmes actifs pertinents.

TRAVAUX DE RECHERCHE



Revue bibliographique :

Emerging opportunities in human pluripotent stem-cells based assays to explore the diversity of botulinum neurotoxins as future therapeutics

Juliette Duchesne de Lamotte^{a,b}, Cécile Martinat^b, Anselme Perrier^c, Camille Nicoleau^{a,*}

Le travail réalisé au cours de ma thèse a fait l'objet d'une revue bibliographique décrivant le contexte de mes recherches qui ont principalement portées sur l'exploitation du potentiel offert par des modèles cellulaires dérivés des cellules souches pluripotentes humaines pour étudier les neurotoxines botuliques. L'objectif principal du mon projet de thèse était le développement de modèles cellulaires humains permettant d'étudier l'effet des neurotoxines sur la transmission synaptique entre un neurone moteur et une cellule musculaire ou entre deux neurones à moyen ou haut débit. Comme décrit dans le chapitre 1 de l'introduction portant sur les neurotoxines botuliques, il existe aujourd'hui peu d'alternatives aux modèles animaux utilisés en routine pour étudier les neurotoxines qui perturbent la fonction synaptique avec certaines spécificités d'espèce. Depuis les premières descriptions des cellules souches pluripotentes, et notamment les cellules souches pluripotentes induites humaines, la mise au point d'essais cellulaires pour étudier les neurotoxines dans un véritable contexte humain devient possible. Ces nouveaux tests cellulaires *in vitro* offrent une valeur translationnelle très appréciable pour l'élaboration de nouvelles thérapeutiques à base de neurotoxines botuliques.

Cette revue sera soumise très prochainement.

Emerging opportunities in human pluripotent stem-cells based assays to explore the diversity of botulinum neurotoxins as future therapeutics

Juliette Duchesne de Lamotte^{a,b}, Cécile Martinat^b, Anselme Perrier^c, Camille Nicoleau^{a,*}

* Corresponding author: camille.nicoleau@ipsen.com

^aIPSEN Innovation, 91940 Les Ulis, France

^bUniversité Evry-Paris Saclay/INSERM UMR861, I-STEM, 91100 Corbeil-Essonnes, France

^cUniversité Paris Saclay/CEA/CNRS UMR9199, Laboratoire des Maladies Neurodégénératives : mécanismes, thérapies, imagerie, 92265 Fontenay-aux-Roses, France

Abstract

Botulinum neurotoxins (BoNTs) are produced by *Clostridium botulinum* and are responsible for botulism, a fatal disorder of the nervous system mostly induced by food poisoning. Despite being one of the most potent family of poisonous substance, BoNTs are used for both aesthetic and therapeutic indications from cosmetic reduction of wrinkles to treatment of movement disorders. The increasing understanding of the biology of BoNTs and the availability of distinct toxin serotypes and subtypes offers the prospect of expanding the range of indications for these toxins. Engineering of BoNTs is considered to provide a new avenue for improving safety and clinical benefit from these neurotoxins. Robust, high-throughput, cost-effective assays for BoNTs activity yet highly relevant to the human physiology have become indispensable for a successful translation of engineered BoNTs to the clinic. This review presents an emerging family of cell-based assays that take advantage of newly developed human pluripotent stem cells and neuronal function analyses technologies.

Keywords: Botulinum neurotoxins ; Cell-based assays ; Human pluripotent stem cells ; High-throughput ; BoNT-based therapeutics.

Abbreviations

ACh: Acetylcholine; AD: Alzheimer's disease; ALS: Amyotrophic lateral sclerosis; BoNTs: Botulinum neurotoxins; Ca²⁺: calcium; CBA: Cell-based assay; ChR2: Channelrhodopsin 2; DAS: Digit abduction score; EMA: European medicines agency; ESCs: Embryonic stem cells; FDA: Food and drug administration; GD/GT: Gangliosides; GECIs: Genetically encoded calcium indicators; HC : Heavy chain; hESCs: Human embryonic stem cells; hiPSCs: Human induced pluripotent stem cells; hPSCs: Human pluripotent stem cells; iPSCs: Induced pluripotent stem cells; LC: Light chain; LD₅₀: Lethal dose 50; MBA: Mousse bioassay; MEA: Microelectrode array; NMJ: Neuromuscular junction; NpHR:

Halorhodopsin; PD: Parkinson's disease; PNHD: Phrenic nerve hemidiaphragm; SMA: Spinal muscular atrophy; SNAP25: Synaptosomal-associated protein 25 KDa; SNARE: Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor; SV2: Synaptic vesicle protein 2; SYT: Synaptotagmin; VAMP: Vesicle associated membrane protein.

1. Introduction

Botulism is a potentially fatal disorder of the nervous system affecting both humans and animals, most often after ingestion of food contaminated with bacteria or spores. Botulism results in progressive flaccid paralysis of motor and autonomic nerves. It was first described in the 1820's by Kerner, who presented a study on several patients suffering from fatal poisoning after ingestion of contaminated sausages. Kerner described in these patients muscular paralysis of respiratory muscles, muscles of the upper and lower limbs, and vegetative disorders such as mydriasis, double vision, gastrointestinal and bladder disorders (Erbguth, 1998, 2004; Erbguth and Naumann, 1999). "Kerner's disease" as it was originally called, later became "botulism" (from the Latin *botulus*, sausage). The number of cases of foodborne botulism increased around the world during the 19th century, mainly as a result of the consumption of sausages but also of smoked fish and low-acid preserved vegetables.

In 1895, Ermengem isolated for the first time an anaerobic bacterium, called *Clostridium botulinum*, from a contaminated ham as well as the intestine and spleen of botulinic patients (Erbguth, 2008; Ermengem, 1897). After the discovery of a new strain of toxin serologically distinct from the one isolated by Ermengem, Burke later established in 1919 an alphabetical nomenclature for the botulinum neurotoxin postulating the existence of different species of *Clostridium botulinum* producing serologically different toxins, botulinum neurotoxins A and B (BoNT/A and BoNT/B) (Burke, 1919; Foster, 2014; Montecucco et al., 1996; 1993). In the 1920s, Sommer and Snipe isolated the neurotoxin for the first time, which lead twenty years later to the development of a purification process of the neurotoxin protein in its crystalline form by Lamanna and colleagues (Lamanna et al., 1946; Sommer et al., 1926).

Despite being considered as one of the most poisonous substance known, with a lethal dose estimated at 0.1-1 ng/Kg in intravenous and 1 µg/Kg orally in Humans, botulinum neurotoxins (BoNTs) have, over the years, successfully become a therapeutic agent for a wide spectrum of disorders especially neurological disorders when injected locally, as well as for aesthetic applications

(Escher et al., 2017; Fonfria et al., 2018; Jabbari, 2016; Pelletier-Cameron and Cox, 2014; Satriyasa, 2019; Shibasaki et al., 2009). Initially used to treat strabismus, the increasing understanding of the biology of the neurotoxins and the availability of distinct toxin serotypes and subtypes offers the prospect of expanding BoNTs indications and resulting therapeutic benefit to a greater range of clinical conditions. One of the major roadblocks facing pharmaceutical development of BoNTs remains the access to robust, affordable humanized cell-based assays. Innovative approaches in the areas of humanized cell-based assays, combined with highly sensitive analytical tools, will be key for the successful development of next generation BoNTs drugs.

The recent advances in stem cell biology have raised expectations for BoNTs research, especially in light of the recent developments in human pluripotent stem cells technologies. Human pluripotent stem cells (hPSCs) are characterized by two main cardinal properties: a capacity to give rise to all the cell type forming an organism, and the capacity to self-renew almost without any limitation. Combined together both properties of hPSCs offer, in theory unlimited access to highly relevant cell source for a range of applications in drug discovery. Two sources of hPSCs, embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs), have shown the most promise in the fields of regenerative and transplant medicine, disease modeling, high-throughput screens for drug discovery and development, and human developmental biology (Liu et al., 2020).

In this review, we examine recent advances in cellular models for the study of BoNTs most particularly those based on hPSCs. We describe their suitability for high-throughput studies including drug screenings aimed at identifying and evaluating novel BoNT-based therapeutics. The design of high-content stem cell-based models has the potential to extend our understanding of BoNTs intoxication process and help harness therapeutic potential of possibly new classes of compounds based on BoNTs. Because the development of BoNT-based compounds is often marred by the lack of physiologically relevant and predictive assays, the use of stem cell-based models offers great opportunity as a valuable and a sensitive system to study biological effects of BoNT in a time and cost-efficient manner. Stem cell models can, under many conditions, provide an alternative to the animal models generally used in the field (Waring et al., 2015).

2. Botulinum neurotoxins

In the last decades, a growing number of studies have contributed to describe the mechanisms by which the BoNTs block neuromuscular transmission (Burgen et al., 1949; Sellin, 1981), the genetic determinant of their activities, their structures and mode of action at the molecular level (Dolly and Aoki, 2006; Dong and Stenmark, 2019; Pirazzini et al., 2017; Rossetto et al., 2014).

BoNT in its native form is protected by multi-protein complexes composed of proteins associated with non-toxic neurotoxins, the Non-Toxic Non-Hemagglutinin (NTNHA) proteins (Gu et al., 2012; Miyashita et al., 2016). These proteins support the transcytosis of BoNT across the intestinal barrier and protect BoNT from gastrointestinal degradation and release it into the circulation. The BoNT thus released migrates to the neuromuscular junctions where it enters the neurons. The free BoNT is a 150 KDa polypeptide composed of two specific chains: an enzymatically active light chain (LC) fragment of 50 KDa attached to a heavy chain (HC) fragment of 100 KDa (Fig. 1). Both chains are linked with an essential disulfide bridge and with a loop from the HC that wraps around the LC (Lacy et al., 1998; Montal, 2010). The HC is divided into two sub-domains including a C-terminal specific neuronal receptor binding domain and a translocation domain. The LC is a N-terminal zinc endopeptidase that can cleave specific subunit of neuronal soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) (Gardner and Barbieri, 2018; Peng Chen et al., 2012; Pirazzini et al., 2017; Rossetto et al., 2014). Neuronal SNARE proteins include syntaxin, synaptosomal-associated protein 25 KDa (SNAP25), and vesicle-associated membrane protein (VAMP, also called synaptobrevin). These SNARE proteins constitute the central components of the eukaryotic molecular machinery that mediate membrane fusion during trafficking and exocytosis of neurotransmitters at the axonal presynaptic terminal allowing the signal communication to the postsynaptic neuron. Neurotransmitters are stored in synaptic vesicles that fuse with the plasma membrane under the action of SNARE proteins in a calcium (Ca^{2+})-dependent manner. The cleavage of neuronal SNARE proteins by BoNT prevents membrane fusion and blocks the release of cholinergic neurotransmitters at the neuromuscular junction, ultimately leading to neuroparalysis.

Neutralizing antibodies can distinguish eight different serotypes of BoNT, from A to H, that are structurally similar but antigenically distinct. Several studies reported that monoclonal antibodies can neutralize only some but not all serotypes suggesting variability within each neurotoxin serotype. Such variabilities are now revealed and explained through sequencing of neurotoxin-encoding genes

of bacteria infecting patient (Smith et al., 2005). BoNT/H has been recently identified and corresponds to a chimeric toxin, with its LC similar to the LC of BoNT/F and its HC similar to the HC of BoNT/A. Furthermore, a new BoNT serotype named BoNT/X, was recently identified (Masuyer et al., 2018; Zhang et al., 2017). BoNT/X has the lowest sequence identity with others serotypes and is not recognized by antisera against known (A-H) serotypes. All serotypes differ in their toxicity, molecular site of action, efficiency in terms of muscle paralysis, duration of effects, specific affinity for their targets (Dong et al., 2007; Giménez and Giménez, 1995; Peck et al., 2017; Poulain and Humeau, 2003; Singh and Kukreja, 2015; Zhang et al., 2017). Each serotype has, for example, distinct binding and/or affinity specificity for different SNARE proteins (i.e BoNT receptors) (Table 1).

Table 1
BoNTs serotypes characteristics.

Serotype	BoNTs receptor	Reference	Target	Reference
A	SV2A, SV2B, SV2C	(Dong, 2006; Mahrhold et al., 2006)	SNAP25	(Binz et al., 1994; Blasi et al., 1993; Schiavo et al., 1993; Washbourne et al., 1997)
B	SYT-I, SYT-II	(Dong et al., 2003; Rummel et al., 2007; Stenmark et al., 2010)	VAMP	(Yamamoto et al., 2012)
C	GD1b, GT1b	(Tsukamoto et al., 2005)	SNAP25, Syntaxin	(Blasi et al., 1993; Foran et al., 1996; Williamson et al., 1996)
D	SV2A, SV2B, SV2C	(Peng et al., 2011)	VAMP	(Schiavo et al., 1993; Yamamoto et al., 2012; Yamasaki et al., 1994)
E	SV2A, SV2B	(Dong et al., 2008; Rummel et al., 2009)	SNAP25	(Binz et al., 1994; Schiavo et al., 1993; Washbourne et al., 1997)
F	SV2A, SV2B, SV2C	(Fu et al., 2009)	VAMP	(Schiavo et al., 1993; Yamamoto et al., 2012; Yamasaki et al., 1994)
G	SYT-I, SYT-II	(Rummel et al., 2004, 2007; Schmitt et al., 2010; Stenmark et al., 2010; Willjes et al., 2013)	VAMP	(Schiavo et al., 1994)
H	SV2A, SV2B, SV2C	(Yao et al., 2017)	VAMP	(Kalb et al., 2015; Maslanka et al., 2016)
X	<i>not identified</i>		VAMP1/2/3/4/5, Ykt6	(Masuyer et al., 2018; Zhang et al., 2017)

BoNTs: botulinum neurotoxins; GD/GT: gangliosides; SNAP25: synaptosomal-associated protein 25 kDa; SV2: synaptic vesicle protein 2; SYT: synaptotagmin; VAMP: vesicle-associated membrane protein.

Physiologically, the neuromuscular transmission starts when a nerve impulse from peripheral or central nervous system reaches the nerve terminal of the neuromuscular junction (NMJ). At the synapse, the depolarization of the presynaptic membrane potential triggers the opening of voltage-gated calcium channels. This increase of intracellular free Ca^{2+} level promotes the activity of Ca^{2+} -dependent SNARE proteins essential for docking and fusion of synaptic vesicles with the synaptic plasma membrane, resulting in exocytosis of their content, the acetylcholine (ACh), in synaptic cleft. ACh then binds to its receptor on the surface of the muscle fiber triggering a new nerve impulse that spreads rapidly along the muscle fiber to make it contract (Duman and Forte, 2003; Martyn et al., 2009). Upon intoxication, BoNT moves to the NMJ, enters host neurons, and inhibits neurotransmitter release by a four-step process (Fig. 2) (Davies et al., 2018; Dressler et al., 2005; Rossetto et al., 2014; Schiavo et al., 2000; Simpson, 2004; Tighe and Schiavo, 2013).

The mechanism of action of BoNTs first involves their binding to receptors in the presynaptic membrane of nerve terminals. The active site of binding localized in the C-terminal HC portion of BoNTs, recognizes two distinct types of receptors simultaneously. The first type corresponds to gangliosides receptors abundantly expressed on neuronal plasma membrane and known to interact with BoNT with low affinity (Schnaar, 2016; Yu et al., 2011). The second type are protein receptors, i.e. synaptic vesicle protein (SV2A, B and C) and synaptotagmin (SYT-I and II). Upon binding to their SV2 or SYT receptors, BoNTs undergo a conformational change and are co-internalized during normal endocytosis of these receptors in the context of their continuous recycling. Inside endocytosome, the conformational change of the LC of the BoNTs is triggered by the lowering of the pH. This conformational change causes the insertion of the two chains (HC and LC) of BoNT in the vesicle membrane, and the formation of a channel. Next, the translocation domain of BoNTs HC permits the translocation of the LC into the cytosol through this channel. Once into the cytosol, BoNTs LC binds and cleaves transmembrane SNARE proteins on the membrane of cholinergic vesicles which consequently prevents the SNARE complex formation and lead to the inhibition of the release of ACh into the synaptic cleft. The LC of BoNT/A and BoNT/E specifically cleave synaptosomal-associated protein 25 kDa (SNAP25), while BoNT serotypes B, D, F, G and H target synaptobrevin (VAMP). BoNT/C cleaves both SNAP25 and syntaxin. BoNT/X cleaves VAMP2/4/5 and the Ykt6 homolog.

The direct consequence of the inhibition of ACh release is a reduction in muscle contractions and afferent signaling at the NMJ, ultimately causing neuroparalysis. This inhibition of synaptic

transmission is temporary and fully reversible, because a synaptic remodeling and a recovery process take place at the NMJ which restore synaptic contacts and implement the restoration of functional neurotransmitter release (Holland and Brown, 1981; Meunier et al., 2002; de Paiva et al., 1999). Indeed, a sprouting phenomenon of terminal endings is observed at the NMJ after prolonged inhibition. This phenomenon of germination of axonal nerve endings gives rise to the regrowth of new synapses, which leads to the renewal of the pool of synaptic vesicles and thus to functional recovery of the NMJ after several weeks. The germination event then continues to expand long after neurotransmission is functional again. Once the major nerve ending regains its maximum capacity to release neurotransmitters, the germination network loses its activity and is eliminated (Foran et al., 2003). In that view, the various BoNT serotypes available offer an interesting range of paralysis longevities.

BoNTs present a significant interest in treating various clinical indications when used in low concentrations. Proper choice of dosage and site of administration are essential determinants of a positive beneficial effect to BoNTs treatment. Despite the great diversity of natural BoNTs, only serotypes A and B are commercially available so far. In addition to being approved by the US Food and Drug Administration (FDA) (Table 2), BoNTs have also been approved in many European countries by the European Medicines Agency (EMA) for similar clinical indications. Some FDA-approved indications are still in the process of evaluation by EMA member countries (Monheit and Pickett, 2017; Walker and Dayan, 2014).

Table 2**BoNTs FDA-approved therapeutic indications.**

Commercial name	Formulation	Serotype	FDA-approved	Date
DYSPORT®	Abobotulinumtoxin	A	Cervical dystonia	2009
			Glabellar lines	2009
			Upper limb spasticity	2015
			Lower limb spasticity (children)	2016
			Lower limb spasticity (adults)	2017
			Spasticity (children)	2020
BOTOX®	Onabotulinumtoxin	A	Blepharospasm	1989
			Strabismus	1989
			Cervical dystonia	2000
			Glabellar lines	2002
			Hyperhidrosis	2004
			Upper limb spasticity (adults)	2010
			Chronic migraine	2010
			Neurogenic overactive bladder	2011
			Urinary incontinence	2011
			Idiopathic overactive bladder	2013
			Lower limb spasticity (adults)	2016
			Upper/Lower limb spasticity (children)	2019
			Spasticity (children)	2020
			XEOMIN®	Incobotulinumtoxin
Strabismus	2010			
Cervical dystonia	2010			
Glabellar lines	2011			
Upper limb spasticity	2015			
Sialorrhea/Excessive drooling	2018			
Blepharospasm/Involuntary blinking	2019			
Chronic sialorrhea	2020			
MYOBLOC/NEUROBLOC®	Rimabotulinumtoxin	B	Blepharospasm	2010
			Strabismus	2010
			Cervical dystonia	2010
			Glabellar lines	2011
			Chronic sialorrhea	2019

FDA: Food and Drug Administration

The natural diversity of BoNTs as well as the increasing knowledge of their activities provide the opportunity to address novel clinical applications. In this context, the development of new cell-based assays to study biological effects of these neurotoxins may help to reduce the time and cost of current models. Several ongoing investigations and clinical trials test the efficiency of BoNTs for new therapeutic indications i.e. epilepsy (Costantin, 2005), tremor (Mittal et al., 2017), tics (Kwak

et al., 2000), depression (Parsaik et al., 2016), endometriosis (Tandon et al., 2019). Up to now, the majority of the current assays used to characterize BoNTs are conducted in animal models with limited physiological relevance, species-specificity and potential for translation to the clinic. Versatility of hPSCs in particular their capacity to generate neuronal cell types relevant to the study of BoNTs position hPSCs as promising new players in the field.

3. BoNTs detection assays

3.1. Rodent bioassays

3.1.1. In vivo bioassay

Currently, the standard assay to test the presence of BoNTs relies on the *in vivo* mouse bioassay (MBA) (Trevan, 1927). This assay is routinely used to detect toxin in suspect contaminated food and environmental samples of botulism and to assess the potency of the therapeutic drug products (Dorner et al., 2012; Ferreira et al., 2004). It is based on the intraperitoneal or intravenous injection of suspected samples in mouse. Animals are then daily monitored for appearance of typical botulism symptoms such as muscle weakness and respiratory failure, typically within one to four days. This assay therefore presents the advantages to detect biologically active toxin independently of their serotypes and to evaluate the potency of BoNTs defined in lethal dose, LD₅₀ Units (which corresponds to the quantity of toxin necessary to kill 50% of injected mice). The MBA also offers a high level of sensitivity, with limits of detection of 5-10 pg/mL (Dunning et al., 2014; Hobbs et al., 2019; Nepal and Jeong, 2020). MBA can also detect all BoNT serotypes which is essential for diagnostic settings.

Despite these advantages, several issues can be raised governing the "3 R's rule": Reduce, Refine, Replace. First ethical considerations for the well-being of the animals have been raised in regard of the large number of mice requested for such assay (Kang et al., 2018; Pellett, 2013). The accuracy of the MBA is also questionable with an error rate estimated up to 40% due to a high variability between laboratories and investigators who need to be qualified and trained (Sesardic et al., 2003; Stern et al., 2018). In addition, this assay is very time-consuming as test animals must be monitored up to 96 hours. It is estimated that more than 130 animals per patient need to be used to test only 3-4 patients (Wilder-Kofie et al., 2011). Finally, interspecies differences between mice and humans may lead to misinterpretations in the results. This is the case with BoNT/B where the potency

is higher in mice than in humans, owing to a residue difference in the SYT-II receptor resulting to a lower binding affinity of BoNT/B for human SYT-II (Elliott et al., 2019; Tao et al., 2017). Similarly, BoNT/C and BoNT/D are active in animals, but do not affect humans (Cobb et al., 2002; Woudstra et al., 2012).

In order to overcome these limitations, efforts have been made to develop alternative solutions. For example, the nonlethal mouse Digit Abduction Score (DAS), recently adapted to rats, has been developed to detect and identify BoNTs serotype after intramuscular injection into lower limb skeletal muscle (Broide et al., 2013; Cornet et al., 2020). Nonetheless, these assays still require large numbers of animals and lack precision and reproducibility due to subjective read-out characterized by the retraction of the limb.

3.1.2. Ex vivo assays

Other approaches to test BoNTs based on *ex vivo* models have been explored. They consist in a continuous measurement of the twitch force elicited by electric stimulation of an isolated explant of adult rodent muscles and nerves in a physiological bath. The mouse or rat phrenic nerve hemidiaphragm (PNHD) assay uses isolated hemidiaphragm muscle with the attached phrenic nerve from euthanized rodents (Bigalke and Rummel, 2015; Dressler et al., 2005; Simpson, 1974). More recently, a new *ex vivo* assay was developed in order to evaluate the effect of different subtypes of BoNTs on smooth muscles issues from bladder preparations (Maignel-Ludop et al., 2017).

Altogether, *ex vivo* assays prove particularly useful to decipher BoNTs mechanism of action and identify intracellular events and receptors involved in neurotoxicity. Although *ex vivo* assays can replace the MBA, they are still based on the use of animals and they require the implementation of expensive technical platforms necessary for all the measurements.

3.2. Cell-based assays

In the last decade, significant progress in the assessment of BoNTs' potency has been made toward reducing animal use. Different cell-based *in vitro* assays (CBA) using specific neuronal cell lines have been implemented to detect multiple steps of BoNTs activity including membrane receptor binding, toxin uptake, translocation and intracellular substrate cleavage (Kiris et al., 2014;

Pellett, 2013). These CBAs are currently the best alternative and the most sensitive assays for studying BoNTs potency and activity.

One of the main read-out used in CBA is SNAP25 cleavage as it can be easily be quantified either by Western Blotting (Jones et al., 2008; Yadirgi et al., 2017), ELISA (Doellgast et al., 1993; Rasooly and Do, 2008), or immunofluorescence assays (Kiris et al., 2011; Rhéaume et al., 2015; Zanetti et al., 2017). Due to the promising results obtained with these systems, especially regarding the determination of pharmacokinetics of purified BoNTs, these assays are now considered as a gold standard in translational study BoNTs. Nonetheless, the cellular system used for these assays appears determinant.

In addition, it is important to note that for several years commercial batches of toxins have been validated with cell-based assays (BOTOX[®] in 2011, XEOMIN[®] in 2015, DYSPORT[®] in 2018).

3.2.1. CBAs based on immortalized cell lines

Immortalized cell lines derived from animal or human cancer cells have been widely used in the field of BoNTs studies for several reasons: (i) these cells self-renew in culture without limitations and can thus be produced in large quantities, (ii) they are easy-to-use and (iii) relatively inexpensive (Escargueil et al., 2011; Kiris et al., 2014; Ray, 1993; Rust et al., 2017). Neuro-2a cells (mouse neuroblastoma) (Yowler et al., 2002), SH-SY5Y (human neuroblastoma) (Purkiss et al., 2001), and SiMa cells (human neuroblastoma) (Fernández-Salas et al., 2012) are now considered as efficient models for studying the biological activity of BoNTs. However different concerns about the use of immortalized cell lines can be raised: (i) their genetic background with regard to transcriptomic and epigenetic context is different from native neurons (i.e motor neurons), (ii) the sensitivity to BoNTs varies according to cell lines requiring either higher doses of toxin and longer times of exposure (2-3 days) for detectable effects (Pellett, 2013). This difference of sensitivity has been shown to result from a variation in term of receptor's expression, substrates and cellular machinery, depending on the immortalized cell lines and the protocol to maintain them *in vitro* (Kiris et al., 2014). For example, pre-incubation of cells with gangliosides increased BoNTs sensitivity (Verderio et al., 2006). In the same way, sensitivity was increased when cells were maintained in a medium containing high concentration of potassium or calcium. Further, immortalized cell lines do not all express the same toxin receptors which causes a difference in sensitivity, this is the case for Neuro-2a cells which express only the SV2C isoform and not SV2A or SV2B isoforms compared to other lines (Dong, 2006).

While immortalized cells have been used, they uniformly fail to recapitulate many neurotypic properties making them unable to model physiological synaptic transmission or network activity.

3.2.2. CBAs based on neuronal primary cultures

Primary neurons can be obtained from different embryonic neural tissues including spinal cord (Restani et al., 2012), dorsal root ganglion (Stahl et al., 2007; Welch et al., 2000), hippocampus (Kroken et al., 2017) and cortex (Pier et al., 2011), and from different species ranging from mouse to chicken embryos. Dissected primary neurons from embryos harbor a high sensitivity to BoNTs intoxication process (Donald et al., 2018; Keller et al., 2004; Whitemarsh et al., 2013). These cells have much greater sensitivity to toxin than immortalized cell lines. Indeed, studies shown that for a similar concentration of toxin, the cleavage of the SNAP25 evaluating by Western Blotting was effective after 24 hours of exposure to the toxin in primary cells, whereas it required at least 48 hours of exposure to observe a cleavage in immortalized cells (Stahl et al., 2007). Contrary to immortalized cell lines, primary cells can differentiate into neurons expressing all the machinery necessary for the intoxication of all BoNTs serotypes (receptors and substrates). Primary neurons can be maintained for long periods (from weeks to months) of time to study BoNTs effects in a serum-free medium optimized for neurons preventing the proliferation of non-neuronal cells (Pellett et al., 2007). Unfortunately, the use of primary neurons often requires the sacrifice of pregnant animals to obtain enough dissected embryos to set up primary neuron cultures for CBA. Another limitation is the heterogeneous nature of primary cultures derived from different dissection leading to variable neuron-glia mix cultures and ultimately variation in measurement of toxin potency. Finally, CBA based on primary culture suffer from biases mediated by species-specificity of BoNTs activity similarly to MBA and other assay based on animal biological resource. Differences related to the species have also been observed and are likely associated with the fact that BoNTs receptors and/or SNARE proteins differ from one species to another (Peng et al., 2012).

4. Emerging cell-based assays using human iPSCs derivatives

4.1. Human induced pluripotent stem cells

Since their discovery more than 20 years ago, hPSCs have ushered in an exciting new era for the fields of stem cell biology and regenerative medicine, as well as disease modeling and drug discovery.

The “physiological” and “natural” source of human pluripotent stem cells are the human embryonic stem cells (hESCs) which are derived from human blastocyst of *in vitro* fertilized embryo (Thomson, 1998). While hESCs are considered as the gold standard of hPSCs, their use has raised ethical issues in different countries. Induced pluripotent stem cells (iPSCs), first described by S. Yamanaka and his group with mouse cells in 2006 then in human cells in 2007, overcome the ethical controversy associated with ESCs and represented a major breakthrough in stem cell research. The possibility of reprogramming human somatic cells into a pluripotent embryonic stem cell state through the expression of a combination of transcription factors (Oct3/4, Sox2, Klf4 and c-Myc) preserving the embryonic stage earned S. Yamanaka the Nobel Prize in Physiology or Medicine in 2012 for this breakthrough. iPSCs reprogramming methods (integrative and non-integrative) have evolved in recent years (integrating and non-integrating methods) (Shi et al., 2017), as well as the tools and methods for quality control of pluripotency and assessment of genomic instabilities of cells (Lefort et al., 2008; Merkle et al., 2017; Taapken et al., 2011). In the same way, the ability to manage the differentiation protocols that produce neuronal, glial, muscular, and other derivatives in an increasingly reproductive way, makes these cells an exciting tool for clinical applications.

The main conditions for hPSC-based therapeutic development rely on the “holy grail” to efficiently and robustly differentiate hPSCs into cell types of interest. Much effort has focused on the differentiation of hiPSCs into mature cell types and the last decades have witnessed the development of more and more robust and efficient protocols allowing the conversion of hiPSCs into a large panel of different cell types such as pancreatic beta cells, hematopoietic cells, cardiomyocytes, skeletal muscle cells and neural cells. Regarding the latter, relevant protocols have been developed raising the possibility easily trigger neural induction (Chambers et al., 2009) and next to have access to a large spectrum of neuronal subtypes such as cortical (Espuny-Camacho et al., 2013; Gribaudo et al., 2019; Shi et al., 2012), dopaminergic (Kirkeby et al., 2012; Kriks et al., 2011; Nolbrant et al., 2017), striatal GABAergic (Aubry et al., 2008; Ma et al., 2012; Nicoleau et al., 2013), hippocampal (Pomeshchik et al., 2020; Yu et al., 2014), motor neurons (Bianchi et al., 2018; Maury et al., 2015).

4.2. Human iPSCs in disease modeling and drug screening

The derivation of hPSCs regardless their origin sparked widespread enthusiasm for the development of new models of human disease, enhanced platforms for drug discovery and more widespread use of cell-based therapy. A couple of pioneering studies have validated the potential of disease-specific hESCs to reflect diseases intrinsic to the cellular level (Eiges et al., 2007; Marteyn et al., 2011; Mateizel et al., 2006; Urbach and Benvenisty, 2009). Given that the isolation of primary diseased ESCs lines was limited by the requirement for a preimplantation genetic diagnosis in the context of *in vitro* fertilization, genetic manipulation of normal ESCs lines was used to introduce disease-relevant molecular defects using contemporary technologies such as RNA interference or homologous recombination (Halevy and Urbach, 2014; Tulpule et al., 2010; Urbach, 2004).

The emergence of reprogramming technology enabled the use of disease-specific hiPSCs circumventing many limitations of disease modeling in ESCs. The genetic basis of a disease is crucial for determining the ways in which it can be modelled, especially when using PSCs. hPSC-based models for monogenic diseases can be obtained by mutagenesis of the disease-associated gene (which has been facilitated by the improvement of gene-editing techniques), by isolation of ESCs from affected blastocysts following preimplantation genetic diagnosis or by reprogramming somatic cells from the patient. These techniques have all been extensively used, creating a growing number of cell repositories. Chromosomal diseases have been modelled using ESCs with chromosomal aberrations (Urbach and Benvenisty, 2009) or ESCs isolated from preimplantation genetic screening embryos (Biancotti et al., 2010), or by reprogramming of somatic cells from patients with chromosomal disorders (Park et al., 2008). Complex diseases, which cannot be diagnosed prenatally or easily reproduced by gene editing, are now modeled using reprogramming of patient cells. Ongoing studies also compare monogenic and complex cases of the same disease. Studies of the complex genetic basis of Alzheimer's disease (AD), a progressive neurologic disease that results in the irreversible loss of neurons particularly in the cortex and hippocampus, highlight multifactorial and heterogeneous characteristics. Although known mutations are at the origin of most early familial forms of AD (mutations of presenilin 1, presenilin 2 and amyloid precursor protein), the complexity of sporadic forms of AD (late-onset AD) due to various factors including aging, sex, and education remains to be studied (Yagi et al., 2011; Zhang et al., 2016). Consequently, there is a need to develop new technologies and models that reflect the progression of AD, confirm the pathology of the disease and predict new or optimal therapeutic strategies. Familial and sporadic models of AD have

established in various preclinical studies, by using iPSCs-reprogramming as basis of AD modeling. Many neurodegenerative diseases have a late clinical onset although pathological changes can occur much earlier, making it difficult to model the disease. Consideration should be given to accelerate pathogenic processes, that is the case in Parkinson's disease (PD), characterized by the loss of neurons in the substantia nigra, where neurons derived from PD patient-specific iPSCs successfully reproduce several disease-related phenotypes after genetic changes that induce aging in cells (progerin expression) (Miller et al., 2013), or after disrupt the system in a stress-inducing way (Bose and Beal, 2019).

Different studies have already demonstrated the importance of disease-based hiPSC models to improve the quality of the selected candidates from the preclinical to the clinical phase of testing. As an example, Roche has announced a major breakthrough in the treatment of spinal muscular atrophy (SMA) with the approval by the FDA of the Risdiplam (commercialized as Evrysdi™) (Ratni et al., 2018; Singh et al., 2020). This molecule, validated on SMA patient hiPSC-derived motor neurons, led to clinically significant improvements in motor function in two clinical trials in patients with SMA, and became the third approved therapy with clear advantages over other approved due to the noninvasive mode of administration coupled with body-wide distribution.

Additionally, the development of high-content screenings allows testing of thousands of compounds in a short period of time and at relatively low cost. Using these approaches, three therapeutic agent candidates were identified in iPSCs-based drug screens by repairing mechanisms involved in amyotrophic lateral sclerosis (ALS), a fatal neurodegenerative disease, and are now being evaluated in clinical trials for efficacy and safety (Okano et al., 2020). Another example of drug screen with relevance for central nervous system disorders is in AD, where researchers focus on non-amyloid targets, including candidate molecules for inflammation, synapse and neuronal protection, vascular factors, neurogenesis, and epigenetic interventions (Cummings et al., 2020).

4.3. Human iPSCs for BoNT research and development

In order to exploit the therapeutic potential of BoNTs, appropriate *in vitro* models are needed allowing to extend the knowledge on their mechanism of action, to characterize and compare them while ensuring the translation to clinic. There are currently few studies in the literature focusing on

the use of hiPSCs for the study of BoNTs (Duchesne de Lamotte et al., 2021; Nicoleau et al., 2018a, 2018b; Pellett et al., 2015, 2019; Schenke et al., 2020; Scherf et al., 2014; Whitemarsh et al., 2012). The use of iPSCs of human origin should increase the species-specific relevance with high sensitivity, and offer the possibility to compare BoNTs serotypes between them (Nepal and Jeong, 2020). Robust and well-characterized protocols to differentiate hPSCs into neurons are constantly in development. The methodology of neuronal differentiation has been well established in hESCs and can be directly applied to hiPSCs. Indeed, the addition of morphogens during the early neural induction steps is often used to drive differentiation towards specific neural subtypes (motor neurons, cortical neurons, dopaminergic neurons, etc.) (Denham and Dottori, 2011; Tao and Zhang, 2016). These specific protocols produce populations of post-mitotic neurons capable of establishing functional synaptic network making functional studies and high throughput possible. In this context, the progress in hiPSCs differentiation into functionally networked neuronals is revolutionizing the use of neuronal models for BoNTs research.

Many studies confirmed that iPSCs-derived neurons (i.e. motor neurons, cortical neurons, dopaminergic neurons, sensory neurons) express all the necessary receptors and substrates for BoNTs intoxication by all serotypes, and are sensitive for detection of several BoNTs serotypes with different potencies, making iPSC-derivatives cells of choice for BoNT research (Duchesne de Lamotte et al., 2021; Elliott et al., 2019; Nicoleau et al., 2018a; Pellett et al., 2019; Schenke et al., 2020; Whitemarsh et al., 2012). Motor neurons derived from hiPSCs have proved to be the most sensitive neurons to BoNTs (Duchesne de Lamotte et al., 2021; Nicoleau et al., 2018a; Pellett et al., 2019). Neurons derived from hiPSCs exhibited appropriate morphology, electrical behaviors, transsynaptic signaling and network activity. This combination of physiological relevance and neuromimetic responses enhances the relevance of the use of hiPSC-derivatives for neurotoxicology studies (McNutt et al., 2015). The appearance of network activity in model generated confirms that differentiation of hiPSCs in neuronal populations can generate synaptically mature neuronal network which is an essential step. Thus hiPSC-derivatives can be incorporated in interesting functional systems to study the different therapeutic fields of application of BoNTs, through coculture systems using hiPSC-derived motor neurons and muscle cells to build a NMJ model (Duchesne de Lamotte et al., 2021), or using hiPSC-derived cortical neurons and astrocytes to build a cortical network model (Kuijlaars et al., 2016). In addition, the use of pertinent coculture systems in the field of BoNT research offer the possibility to test and compare different BoNTs serotypes whatever their SNARE substrate in

more physio-relevant systems, also to study BoNTs intoxication at the synapse level that recapitulate cell-cell interactions and connection.

The development of hiPSC-based system and the progress made in recent years on increasingly robust hiPSCs differentiation protocols has resulted in the creation of more physiological and functional models for drug screening in miniaturized format to build attractive systems that are translational for preclinic and clinic research. Combined with the progress made in high-throughput technologies, it is possible to evaluate more complex and precise functional parameters including the flow of Ca^{2+} within and between connected cells, the electrical activity, the activity of part of the system, the connection between the cells composing the system, the activation or inhibition of a part of the system.

4.4. Example of cell-based functional assays

4.4.1. Electrophysiology

Properties of ion channel function is routinely measured by patch clamp which is considered the gold standard for analysis of membrane electrical activity. This electrophysiological procedure was first developed by Neher and Sakmann in 1976 and allows precise control of the transmembrane voltage and recording of currents across the membrane. Considerable effort to automate the technique has been made for pharmacological testing of compounds to evaluate the potency of compounds-channel interactions. Progress has been achieved on the miniaturization and automation of the electrophysiological set up to increase the throughput and sensitivity of simultaneous recording of single cell, and assess cumulative or multiple compound additions (Dunlop et al., 2008; Yu et al., 2016). A method combining both fluorescence-based technologies and automated patch clamp became commonly used for ion-channel-targeted drug discovery, allowing also to differentiate more easily the sub-types of ion channels.

In the area of BoNTs research, channel-specific toxins have multiple mechanisms of action, including interference of ion-channel opening. BoNTs binding alters normal conformational changes required to open or close activated channels which can cause uncontrolled neuronal excitation, large or limited neurotransmitter release, and muscle spasm. BoNTs are a typical example of toxin-induced structural change causing alterations in neuronal network electrophysiology by reducing or

interrupting the synaptic signal (Arezzo et al., 2011). Several studies based on *in vitro* neuronal cultures derived from rodent stem cells demonstrated that the synaptic transmission, measured through synaptic currents, was impaired and near-total silenced in response to BoNT/A intoxication using patch-clamp electrophysiology (Hubbard et al., 2015). These studies also highlighted a synapse sub-population specific latency toward BoNTs intoxication after measurements of synaptic activity, revealing that glutamatergic synapses are intoxicated less rapidly than GABAergic synapses (Beske et al., 2015). Functional measurements of BoNTs intoxication in synaptically active neuronal cultures, and the difference in sensibility between sub-populations, should pave the way to new BoNT-based therapeutic screening and mechanistic studies.

4.4.2. Microelectrode array

Multi-well microelectrode array (MEA) are robust platforms for the assessment of the impact of pharmacological compounds on the function of electrically active cellular network. MEA were originally applied to investigate neuronal activity but were later applied to other type of electrical active cells such as cardiac cells. MEA was introduced in the 1970s by Thomas and his colleagues as an *in vitro* system to monitor effects of drugs and to perform functional studies under physiological or induced pathological conditions that mimic *in vivo* damages (Thomas Jr et al., 1972). MEA offers the possibility for non-invasive extracellular recording of cells activity and networks, enabling the real-time analysis of activity in multiple locations in cultured cells. This technique became a powerful tool to investigate changes induced by chronic treatment with pharmacological compounds on the electrophysiological activity of cellular network for a long period of time (Bradley and Strock, 2019; Stett et al., 2003). Firing rates, burst characteristics and network synchrony are important aspects of electrophysiological-active cellular networks to consider.

The combination of MEA systems and stem cells has recently been successfully applied to the study of neuroactive compounds on neuronal population cultured on top of MEA. In BoNTs research, MEA was used to evaluate the potency and efficiency of BoNTs. The establishment of an *in vitro* model based on neuronal cultures derived from murine ESCs allowed to assess alterations in synaptic transmission through burst activity measurement after BoNT/A treatment (Jenkinson et al., 2017). This method allowed to detect a dose and time-dependent inhibition of synaptic transmission of BoNTs. As a result, MEA measurements can provide important functional information to establish personalized drug treatments and open a new avenue for new BoNTs therapeutics. In the field of

neurology and particularly in epilepsy, a recent study evidence convulsion toxicity of new drugs and the neurological effects of antiepileptic drugs using such system (Odawara et al., 2018). In this study, MEAs were used to evaluate antiepileptic drugs responses in hiPSC-derived neurons treated with seizure-inducing drugs. The authors measured synchronized bursts firing in the epileptiform activities and compared their results to *in vivo* convulsive responses of the same drugs. This study also demonstrated the importance to co-culture neurons and astrocytes to enhance the signal recorded and increase the physiological relevance of the cell-based model used. Because the preclinical phase of drug discovery, particularly toxicity and efficacy evaluation are often issues lately identified in clinical trials, the comparison between *in vitro* and *in vivo* is essential, making this case a typical example of an effective evaluation system for the development of drug discovery.

4.4.3. Optogenetics

Optogenetics, first developed in 2005, is a non-invasive genetic method that involves the use of light to control the activity of cells with both high temporal and high spatial precision (Boyden et al., 2005). Because optogenetics allows selective targeting of individual cell types and activation or inhibition of their activity with a millisecond-scale time resolution, it offers a high degree of specificity and control over cellular network activity. This method requires the use of light-activated proteins called microbial opsins such as channelrhodopsin-2 (ChR2) for activation and halorhodopsin (NpHR) for silencing of cells (Mohanty and Lakshminarayanan, 2015; Montagni et al., 2019). ChR2 is a light-gated cation channel activated by blue light (470 nm) with high temporal precision. It is used to depolarize neurons and thus can generate an action potential when applied to neurons. Conversely, NpHR is a light-gated chloride pump activated by yellow light (580 nm) causing hyperpolarization of cells used to silence excitable cells. Since opsins are not fluorescent, plasmid encoding for opsins are fused with fluorescent reporter protein for visualizing their expression into cells. In addition, appropriate promoter in the genetic construct can be used for cell-specific stimulation in genetically-targeted cells. In the past years, mutations in the opsin-constructs allowed the stimulation spectrum to be extended with red-shifted opsin variants (590-630 nm), non-toxic for cells and with a better sensitivity (Lin et al., 2013). Optogenetic is more specific and multiple types of excitable cells can be targeted at the same region of interest. In neurology, this approach has enabled scientists to causally link cellular circuits, behavior and function.

Optogenetic has the potential to contribute throughout the drug discovery pipeline to identify compounds that improve cell function, whether the compound acts directly on a target or through another mechanism. A recent study on neuromuscular defects in ALS revealed the therapeutic potential of several compounds using optogenetics (Osaki et al., 2020). A physiological and pathological ALS-specific iPSCs-derived 3D human neuromuscular models were established using cells under optogenetic control. With the optogenetic control, motor neurons firing was elicited by light by activating the ChR2 express inside cells, and the resulting muscle contraction response was measured. Muscle contractile force is an interesting quantified indicator of drug potency. The authors measured the effect of several compounds on neuromuscular functions in both models. This method facilitates pathological mechanisms behind disorders, the investigation of hit compounds and even allows primary drug screening with functional read-outs on excitable cells.

Efforts to achieve optogenetic control of excitable cells have been paralleled with the generation of a variety of calcium indicators that display precise measurable fluorescent changes upon network activity such as fluorogenic calcium-sensitive dye or genetically encoded Ca^{2+} indicators (GECIs). The use of GECIs eliminates the cytotoxic effects of calcium synthetic indicators commonly used to observe calcium mobilization in cells (Cameron et al., 2016), and enables longitudinal studies because its expression is maintained indefinitely. The simultaneous use of optogenetics and Ca^{2+} fluorescence-based recording opens new opportunities for the study of neuronal circuits such as the activation or inhibition of a synaptic component when imaging the activity of the downstream synaptic component, or the manipulation of a defined population of cells when imaging a distinct group of cells.

Recently, BoNTs themselves have been the subject of optogenetic engineering. Liu and colleagues described a blue light activatable BoNTs engineered to disrupt excitatory neurotransmission resulting in persistent synaptic inhibition triggered by light (Liu et al., 2019). Using optogenetics approach, the long-term disruption of synaptic transmission induced by the direct application of BoNTs and the resulting changes (in terms of behavior, cellular mechanisms, ions transient) could be evaluated after activation of photoactivatable-engineered synapses, which will allow the entire system to be controlled. In that way, the effects of different BoNTs serotypes could be measured after overactivation of the synapse with optogenetics, in order to establish guidelines for future therapeutics.

5. Challenges and future perspectives

Although hiPSC-derived systems are relevant tools with considerable advantage for BoNTs study including at high-throughput context, BoNTs activity in human arises in the context of complex multicellular tissues and organ systems and is dependent on multiple interactions occurring between cells, extracellular matrices, and pathogens. Consequently, more complex iPSCs-based differentiation systems (i.e. 3D systems, engineered tissue, organ-on-chip, and organoids) are currently being developed to faithfully recapitulate human tissue-level and organ-level dysfunctions (Kim et al., 2020; Liu et al., 2018; Takebe et al., 2017). Organoids are unique, in that they are self-organizing, 3D culture systems that are highly similar to human organs (Dutta et al., 2017). A variety of iPSCs-derived organoids mimicking the brain (Kim et al., 2019), retina (Völkner et al., 2016), liver (Sampaziotis et al., 2015), lung (Wilkinson et al., 2017), kidney (Freedman et al., 2015) and heart (Richards et al., 2020) have been developed. Organoids exhibit sophisticated 3D architecture and contain many of the cell types found in the *in vivo* tissues they reproduce. In this part we will mainly discuss the progress made on the modeling of the NMJ, the target of choice for the study of BoNTs.

Significant advance in the generation of 2D culture systems and recently in 3D culture systems open new perspectives for BoNTs research (Barbeau et al., 2020). While 2D cultures are limited because they do not reproduce the entire structure and hierarchical connectivity that is observed in 3D cultures, and do not mimic the native tissue structure, they remain advantageous in terms of quality, reproducibility and timeliness (Table 3). The expansion of spheroids and organoids systems provide models with enhanced structural and morphological relevance in the generation of models that resemble a human NMJ system.

Table 3**Comparison of 2D and 3D cell culture strategies.**

	2D culture	3D culture
Culture quality	High reproducibility, long-term culture, simplicity of culture	Low reproducibility, cultures more difficult to carry out
<i>In vivo</i> modeling	Not mimic the native structure of the tissue	Tissues and organs are in 3D form
Extracellular environment	No <i>in vivo</i> -like microenvironment and no niches	Environmental niches are created
Cells characteristics	Loss of diverse phenotype and polarity	Preservation of diverse phenotype and polarity
Access to essential compounds	Unlimited access to oxygen, nutrients, signaling molecules	Variable access to oxygen, nutrients, signaling molecules
Cost	Cheap, commercially available medium and products	Expensive, more time-consuming, fewer commercially available products

Faustino Martins and colleagues established a 3D human neuromuscular organoid system that self-organize and form functional NMJ (Faustino Martins et al., 2020). Muscle cells functionality was measured with the calcium imaging combined to MEA to evaluate neuronal network activity. The main advantages of this model are such culture can be maintained for longer periods (months than a year), and that they allow the generation of unique structures in which all the components of the NMJ are present including the Schwann cells which are essential for the NMJ maturation and homeostasis. This model reveals physiological endogenous interactions between all cell types inside organoids, giving access to the study of key human developmental events of the NMJ and allowing to decipher the contribution of each cell types to NMJ genetic disorders. Another study from Andersen and colleagues established 3D human cortico-motor assembloids to recreate a multi-synaptic circuit which regulates the neuronal activity in the hindbrain and spinal cord to generate coordinated movement (Andersen et al., 2020). The functionality of the synaptically connected assembloids was measured using calcium imaging and patch clamp recordings. Glutamate and optogenetic stimulations used in this study revealed a contractile response of 3D muscle to neuronal stimulation. This system also illustrates the ability of 3D cultures to self-assemble to form functional circuits that can be used to understand development and disease. iPSC-derived 3D human neuromuscular organoid or assembloid systems constitute uniquely attractive system to study neuromuscular disease and to develop or validate candidate therapies.

3D models provide important information in understanding several mechanisms underlying neuronal network function and homeostasis, but they do not fully replicate the exact human physiological functional units formed by the connection of different excitable cell types, resulting from separated cellular microenvironments. To address this need, compartmentalized microfluidic technology represent an alternative to 3D system to recreate NMJ physiology of human *in vitro*. Bellman and coworkers, as well as Osaki and colleagues, developed a microfluidic systems to model NMJ by creating a specific cell microenvironment for hPSC-derived motor neurons and hPSC-derived muscle cells (Bellmann et al., 2019; Osaki et al., 2020). Such microfluidic system facilitates imaging and quantitative functional evaluation. These authors generated a functional NMJ that mature in few weeks on microfluidic chips and used optogenetics to demonstrate the functionality of neuromuscular circuits. With this system, pathological behaviors associated with neuromuscular diseases (e.g. degeneration and death of motor neurons, muscle atrophy) can be recapitulated using patient-derived iPSCs to generate motor neurons and muscle cells used. Overall, the throughput allowed by 3D or microfluidic set-up remains until now limited to only medium throughput applications in the drug discovery pipeline.

Despite the fact that synapses including the NMJ are complex multi-cellular 3D structures, the majority of drug screening and safety or efficacy measurement are still carried out using mono-culture of cells grown a 2D monolayer (Miranda and Cabral, 2020; Takahashi, 2019). Not surprisingly, drug responses in these *in vitro* models are often poorly predictive of *in vivo* situations. In the field of BoNTs study, the generation of robust 3D and multicellular systems would make it possible to compare all aspects of the different BoNTs serotypes and also to focus on new pathways that could be interesting for the development of future BoNT-based therapeutics.

6. Conclusions

Recent studies have established the versatility of hPSCs to generate clinically and biologically relevant multicellular models. For BoNTs detection and mechanistic studies, various cell models currently exist, but none examine BoNTs function with species-specific relevance while exhibiting high sensitivity.

To study BoNTs, preferential models have been developed over the years: *in vivo*, BoNT-induced muscle relaxation is assessed in mice and rats (MBA) ; BoNT potency was evaluated *ex vivo*

on mice hemidiaphragms, measuring muscle contractility; BoNT potency was preferentially assessed *in vitro* in rodent primary cells (CBA). All these models have several limitations such as the requirement for significant technical expertise and highly skilled personnel to implement the assays, reproducibility and stability, cross species differences limiting translation of data from animals; they also raise important ethical concerns regarding the large number of rodents require by these assays. In this context, more physiologically and predictively relevant models are needed. Human iPSCs technology offers the opportunity to study BoNTs in relevant humanized context making cell-based assays crucial for the advancement of BoNT research and drug discovery. The continuous development of robust protocols for the differentiation of hiPSCs into various neuronal sub-populations opens the door to comparative studies of different BoNTs serotypes in different neuronal sub-populations. Several studies have shown that hiPSC-derived neurons were highly BoNT-sensitive models with different sensitivities depending on the BoNTs serotypes. Moreover, the generation of a variety of neurons of different phenotypes (motor neurons, GABAergic, glutamatergic, dopaminergic, sensory, etc.) allows the development of more complex, translational and predictive cell-based systems to help in the development of a panel of BoNT-based future therapeutics in the areas of movement disorders, neurological diseases, neurodegenerative diseases, pain and other disorders.

The complexity, in terms of the number and interconnectivity of cell types, maturity, and differentiated state of most cells of the human nervous system is difficult to replicate in cell-based models. One important aspect of cell-based assay is the read-outs often provide information on cell viability, morphology and neuron-specific functional activity in addition to the primary output. Progress in high-throughput assays can provide information on multiple functional parameters such as electrical activity, network synchrony, calcium transient. In this sense, human neuronal cells derived from iPSCs are attractive models because they exhibit the function, connectivity and behavior of mature neurons in a synaptic network.

To identify network activity in a high-content manner, multiple laboratories have employed electrophysiology, MEA, and more recently optogenetics platforms to evaluate in a high-content context the activity of a neuronal network by using relevant read-outs such as calcium signaling. Several studies showed the efficacy of these techniques to record the activity of synaptic networks which is an emerging target for the development of future therapeutics. Taking advantage of hiPSCs-derived systems, sophistication of models (3D, organoids), and high-throughput functional assays,

the study of the effect of different BoNTs serotypes on synapses such as NMJ, but also on other neuronal synapses, should open the way to new BoNT-based therapeutics.

Figures and captions

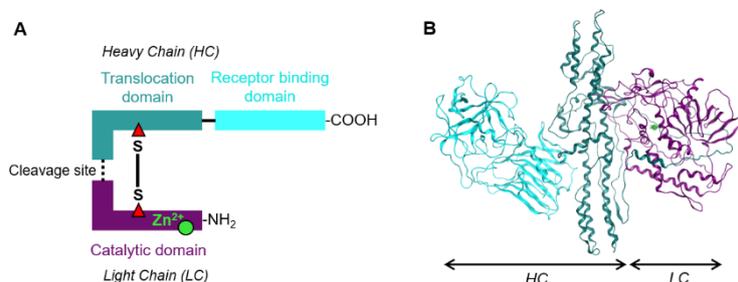


Fig. 1. BoNT structure. (A) Schematic illustration of BoNT/A structure composed of the light chain (LC) peptide fragment (50 KDa) linked with a disulfide bond (S-S) to the heavy chain (HC) peptide fragment (100 KDa). The LC is a zinc (Zn^{2+}) endopeptidase responsible for catalytic activity, and the HC comprises a receptor binding domain responsible for neurospecific targeting and a translocation domain responsible for the LC translocation ; **(B)** Illustration of BoNT/A crystalline structure. Same colors represent same elements in both parts of the figure.

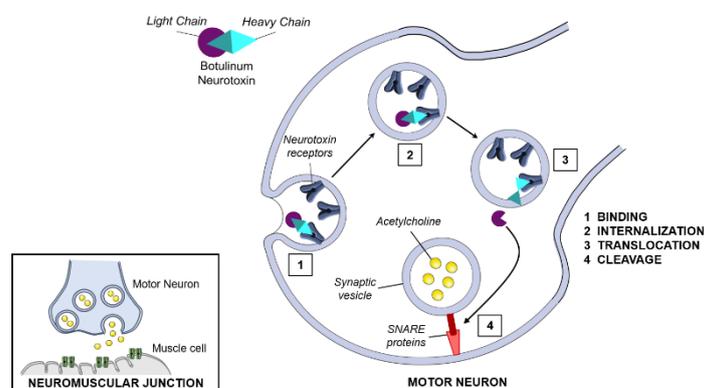


Fig. 2. Schematic representation of BoNTs cellular mechanism of action. BoNTs intoxication consists of four steps: binding, internalization, translocation and cleavage. BoNTs bind to specific receptors via its heavy chain, leading the internalization into the neuron. Once internalized into an endosome, the decrease in pH activates the heavy chain translocation domain, which detaches from the light chain. The light chain moves into the cytosol and binds its appropriate SNARE substrate based on BoNTs serotype. SNARE cleavage blocks the release of acetylcholine into the neuromuscular junction affecting motor neuron function and the resulting muscle contraction.

References

- Andersen, J., Revah, O., Miura, Y., Thom, N., Amin, N.D., Kelley, K.W., Singh, M., Chen, X., Thete, M.V., Walczak, E.M., et al. (2020). Generation of Functional Human 3D Cortico-Motor Assembloids. *Cell* *183*, 1913-1929.e26.
- Arezzo, J.C., Litwak, M.S., and Zotova, E.G. (2011). Correlation and Dissociation of Electrophysiology and Histopathology in the Assessment of Toxic Neuropathy. *Toxicol. Pathol.* *39*, 46–51.
- Aubry, L., Bugi, A., Lefort, N., Rousseau, F., Peschanski, M., and Perrier, A.L. (2008). Striatal progenitors derived from human ES cells mature into DARPP32 neurons in vitro and in quinolinic acid-lesioned rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 16707–16712.
- Barbeau, S., Tahraoui-Bories, J., Legay, C., and Martinat, C. (2020). Building neuromuscular junctions *in vitro*. *Development* *147*, dev193920.
- Bellmann, J., Goswami, R.Y., Girardo, S., Rein, N., Hosseinzadeh, Z., Hicks, M.R., Busskamp, V., Pyle, A.D., Werner, C., and Sterneckert, J. (2019). A customizable microfluidic platform for medium-throughput modeling of neuromuscular circuits. *Biomaterials* *225*, 119537.
- Beske, P.H., Scheeler, S.M., Adler, M., and McNutt, P.M. (2015). Accelerated intoxication of GABAergic synapses by botulinum neurotoxin A disinhibits stem cell-derived neuron networks prior to network silencing. *Front. Cell. Neurosci.* *9*.
- Bianchi, F., Malboubi, M., Li, Y., George, J.H., Jerusalem, A., Szele, F., Thompson, M.S., and Ye, H. (2018). Rapid and efficient differentiation of functional motor neurons from human iPSC for neural injury modelling. *Stem Cell Res.* *32*, 126–134.
- Biancotti, J.-C., Narwani, K., Buehler, N., Mandefro, B., Golan-Lev, T., Yanuka, O., Clark, A., Hill, D., Benvenisty, N., and Lavon, N. (2010). Human Embryonic Stem Cells as Models for Aneuploid Chromosomal Syndromes. *STEM CELLS* *28*, 1530–1540.
- Bigalke, H., and Rummel, A. (2015). Botulinum Neurotoxins: Qualitative and Quantitative Analysis Using the Mouse Phrenic Nerve Hemidiaphragm Assay (MPN). *Toxins* *7*, 4895–4905.
- Binz, T., Blasi, J., Yamasaki, S., Baumeister, A., Link, E., Südhof, T.C., Jahn, R., and Niemann, H. (1994). Proteolysis of SNAP-25 by types E and A botulinum neurotoxins. *J. Biol. Chem.* *269*, 1617–1620.
- Blasi, J., Chapman, E.R., Yamasaki, S., Binz, T., Niemann, H., and Jahn, R. (1993). Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *EMBO J.* *12*, 4821–4828.
- Bose, A., and Beal, M.F. (2019). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in induced pluripotent stem cell models of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* *49*, 525–532.
- Boyden, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., and Deisseroth, K. (2005). Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* *8*, 1263–1268.
- Bradley, J.A., and Strock, C.J. (2019). Screening for Neurotoxicity with Microelectrode Array. *Curr. Protoc. Toxicol.* *79*, e67.

- Broide, R.S., Rubino, J., Nicholson, G.S., Ardila, M.C., Brown, M.S., Aoki, K.R., and Francis, J. (2013). The rat Digit Abduction Score (DAS) assay: A physiological model for assessing botulinum neurotoxin-induced skeletal muscle paralysis. *Toxicon* *71*, 18–24.
- Burgen, A.S.V., Dickens, F., and Zatman, L.J. (1949). The action of botulinum toxin on the neuromuscular junction. *J. Physiol.* *109*, 10–24.
- Burke, G.S. (1919). Notes on Bacillus Botulinus. *J. Bacteriol.* *4*, 555–570.1.
- Cameron, M., Kékesi, O., Morley, J.W., Tapson, J., Breen, P.P., van Schaik, A., and Buskila, Y. (2016). Calcium Imaging of AM Dyes Following Prolonged Incubation in Acute Neuronal Tissue. *PLOS ONE* *11*, e0155468.
- Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat. Biotechnol.* *27*, 275–280.
- Cobb, S.P., Hogg, R.A., Challoner, D.J., Sharpe, R.T., Brett, M.M., Livesey, C.T., and Jones, T.O. (2002). Suspected botulism in dairy cows and its implications for the safety of human food. *Vet. Rec.* *150*, 5–8.
- Cornet, S., Périer, C., and Kalinichev, M. (2020). Optimization of the rat digit abduction score (DAS) assay: Evaluation of botulinum neurotoxin activity in the gastrocnemius lateralis, peronei, and extensor digitorum longus. *Toxicon X* *6*, 100029.
- Costantin, L. (2005). Antiepileptic Effects of Botulinum Neurotoxin E. *J. Neurosci.* *25*, 1943–1951.
- Cummings, J., Lee, G., Ritter, A., Sabbagh, M., and Zhong, K. (2020). Alzheimer’s disease drug development pipeline: 2020. *Alzheimers Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* *6*.
- Davies, J., Liu, S., and Acharya, K. (2018). Variations in the Botulinum Neurotoxin Binding Domain and the Potential for Novel Therapeutics. *Toxins* *10*, 421.
- Denham, M., and Dottori, M. (2011). Neural Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells. In *Neurodegeneration*, G. Manfredi, and H. Kawamata, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 99–110.
- Doellgast, G.J., Triscott, M.X., Beard, G.A., Bottoms, J.D., Cheng, T., Roh, B.H., Roman, M.G., Hall, P.A., and Brown, J.E. (1993). Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Clostridium botulinum neurotoxins A, B, and E using signal amplification via enzyme-linked coagulation assay. *J. Clin. Microbiol.* *31*, 2402–2409.
- Dolly, J.O., and Aoki, K.R. (2006). The structure and mode of action of different botulinum toxins. *Eur. J. Neurol.* *13*, 1–9.
- Donald, S., Elliott, M., Gray, B., Hornby, F., Lewandowska, A., Marlin, S., Favre-Guilmond, C., Périer, C., Cornet, S., Kalinichev, M., et al. (2018). A comparison of biological activity of commercially available purified native botulinum neurotoxin serotypes A1 to F1 in vitro, ex vivo, and in vivo. *Pharmacol. Res. Perspect.* *6*, e00446.

- Dong, M. (2006). SV2 Is the Protein Receptor for Botulinum Neurotoxin A. *Science* 312, 592–596.
- Dong, M., and Stenmark, P. (2019). The Structure and Classification of Botulinum Toxins. In *Botulinum Toxin Therapy*, S.M. Whitcup, and M. Hallett, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 11–33.
- Dong, M., Richards, D.A., Goodnough, M.C., Tepp, W.H., Johnson, E.A., and Chapman, E.R. (2003). Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J. Cell Biol.* 162, 1293–1303.
- Dong, M., Tepp, W.H., Liu, H., Johnson, E.A., and Chapman, E.R. (2007). Mechanism of botulinum neurotoxin B and G entry into hippocampal neurons. *J. Cell Biol.* 179, 1511–1522.
- Dong, M., Liu, H., Tepp, W.H., Johnson, E.A., Janz, R., and Chapman, E.R. (2008). Glycosylated SV2A and SV2B Mediate the Entry of Botulinum Neurotoxin E into Neurons. *Mol. Biol. Cell* 19, 5226–5237.
- Dorner, M.B., Schulz, K.M., Kull, S., and Dorner, B.G. (2012). Complexity of Botulinum Neurotoxins: Challenges for Detection Technology. In *Botulinum Neurotoxins*, A. Rummel, and T. Binz, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 219–255.
- Dressler, D., Saberi, F.A., and Barbosa, E.R. (2005). Botulinum toxin: mechanisms of action. *Arq. Neuropsiquiatr.* 63, 180–185.
- Duchesne de Lamotte, J., Roqueviere, S., Gautier, H., Raban, E., Bouré, C., Fonfria, E., Krupp, J., and Nicoleau, C. (2021). hiPSC-Derived Neurons Provide a Robust and Physiologically Relevant In Vitro Platform to Test Botulinum Neurotoxins. *Front. Pharmacol.* 11.
- Duman, J.G., and Forte, J.G. (2003). What is the role of SNARE proteins in membrane fusion? *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 285, C237–C249.
- Dunlop, J., Bowlby, M., Peri, R., Vasilyev, D., and Arias, R. (2008). High-throughput electrophysiology: an emerging paradigm for ion-channel screening and physiology. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 358–368.
- Dunning, F.M., Piazza, T.M., Zeytin, F.N., and Tucker, W.C. (2014). Isolation and quantification of botulinum neurotoxin from complex matrices using the BoTest matrix assays. *J. Vis. Exp. JoVE*.
- Dutta, D., Heo, I., and Clevers, H. (2017). Disease Modeling in Stem Cell-Derived 3D Organoid Systems. *Trends Mol. Med.* 23, 393–410.
- Eiges, R., Urbach, A., Malcov, M., Frumkin, T., Schwartz, T., Amit, A., Yaron, Y., Eden, A., Yanuka, O., Benvenisty, N., et al. (2007). Developmental Study of Fragile X Syndrome Using Human Embryonic Stem Cells Derived from Preimplantation Genetically Diagnosed Embryos. *Cell Stem Cell* 1, 568–577.
- Elliott, M., Favre-Guilmard, C., Liu, S.M., Maignel, J., Masuyer, G., Beard, M., Boone, C., Carré, D., Kalinichev, M., Lezmi, S., et al. (2019). Engineered botulinum neurotoxin B with improved binding to human receptors has enhanced efficacy in preclinical models. *Sci. Adv.* 5, eaau7196.
- Erbguth, F.J. (1998). Botulinum toxin, a historical note. *The Lancet* 351, 1820.

- Erbguth, F.J. (2004). Historical notes on botulism, *Clostridium botulinum*, botulinum toxin, and the idea of the therapeutic use of the toxin. *Mov. Disord.* *19*, S2–S6.
- Erbguth, F.J. (2008). From poison to remedy: the chequered history of botulinum toxin. *J. Neural Transm.* *115*, 559–565.
- Erbguth, F.J., and Naumann, M. (1999). Historical aspects of botulinum toxin: Justinus Kerner (1786–1862) and the “sausage poison.” *Neurology* *53*, 1850–1850.
- Ermengem, E. van (1897). Ueber einen neuen anaeroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus (Z Hyg Infektionskrankh).
- Escargueil, C.R., Machado, C.B., Blanc, R.P., Fleck, R.A., and Sesardic, D. (2011). Enhanced sensitivity to Botulinum type A neurotoxin of human neuroblastoma SH-SY5Y cells after differentiation into mature neuronal cells. *Botulinum J* *2*, 30.
- Escher, C.M., Paracka, L., Dressler, D., and Kollwe, K. (2017). Botulinum toxin in the management of chronic migraine: clinical evidence and experience. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* *10*, 127–135.
- Espuny-Camacho, I., Michelsen, K.A., Gall, D., Linaro, D., Hasche, A., Bonnefont, J., Bali, C., Orduz, D., Bilheu, A., Herpoel, A., et al. (2013). Pyramidal Neurons Derived from Human Pluripotent Stem Cells Integrate Efficiently into Mouse Brain Circuits In Vivo. *Neuron* *77*, 440–456.
- Faustino Martins, J.-M., Fischer, C., Urzi, A., Vidal, R., Kunz, S., Ruffault, P.-L., Kabuss, L., Hube, I., Gazzo, E., Birchmeier, C., et al. (2020). Self-Organizing 3D Human Trunk Neuromuscular Organoids. *Cell Stem Cell* *26*, 172–186.e6.
- Fernández-Salas, E., Wang, J., Molina, Y., Nelson, J.B., Jacky, B.P.S., and Aoki, K.R. (2012). Botulinum Neurotoxin Serotype a Specific Cell-Based Potency Assay to Replace the Mouse Bioassay. *PLoS ONE* *7*, e49516.
- Ferreira, J.L., Eliasberg, S.J., Edmonds, P., and Harrison, M.A. (2004). Comparison of the Mouse Bioassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Procedures for the Detection of Type A Botulinum Toxin in Food. *J. Food Prot.* *67*, 203–206.
- Fonfria, E., Maignel, J., Lezmi, S., Martin, V., Splevins, A., Shubber, S., Kalinichev, M., Foster, K., Picaut, P., and Krupp, J. (2018). The Expanding Therapeutic Utility of Botulinum Neurotoxins. *Toxins* *10*, 208.
- Foran, P., Lawrence, G.W., Shone, C.C., Foster, K.A., and Dolly, J.O. (1996). Botulinum Neurotoxin C1 Cleaves both Syntaxin and SNAP-25 in Intact and Permeabilized Chromaffin Cells: Correlation with Its Blockade of Catecholamine Release[†]. *Biochemistry* *35*, 2630–2636.
- Foran, P.G., Davletov, B., and Meunier, F.A. (2003). Getting muscles moving again after botulinum toxin: novel therapeutic challenges. *Trends Mol. Med.* *9*, 291–299.
- Foster, K.A. (2014). *Molecular aspects of botulinum neurotoxin* (New York: Springer).

- Freedman, B.S., Brooks, C.R., Lam, A.Q., Fu, H., Morizane, R., Agrawal, V., Saad, A.F., Li, M.K., Hughes, M.R., Werff, R.V., et al. (2015). Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids. *Nat. Commun.* *6*.
- Fu, Z., Chen, C., Barbieri, J.T., Kim, J.-J.P., and Baldwin, M.R. (2009). Glycosylated SV2 and Gangliosides as Dual Receptors for Botulinum Neurotoxin Serotype F. *Biochemistry* *48*, 5631–5641.
- Gardner, A., and Barbieri, J. (2018). Light Chain Diversity among the Botulinum Neurotoxins. *Toxins* *10*, 268.
- Giménez, D.F., and Giménez, J.A. (1995). The typing of botulinal neurotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* *27*, 1–9.
- Gribaudo, S., Tixador, P., Bousset, L., Fenyi, A., Lino, P., Melki, R., Peyrin, J.-M., and Perrier, A.L. (2019). Propagation of α -Synuclein Strains within Human Reconstructed Neuronal Network. *Stem Cell Rep.* *12*, 230–244.
- Gu, S., Rumpel, S., Zhou, J., Strotmeier, J., Bigalke, H., Perry, K., Shoemaker, C.B., Rummel, A., and Jin, R. (2012). Botulinum Neurotoxin Is Shielded by NTNHA in an Interlocked Complex. *Science* *335*, 977–981.
- Halevy, T., and Urbach, A. (2014). Comparing ESC and iPSC—Based Models for Human Genetic Disorders. *J. Clin. Med.* *3*, 1146–1162.
- Hauschild, A.H.W. (1993). *Clostridium botulinum: ecology and control in foods* (New York: M. Dekker).
- Hobbs, R.J., Thomas, C.A., Halliwell, J., and Gwenin, C.D. (2019). Rapid Detection of Botulinum Neurotoxins—A Review. *Toxins* *11*, 418.
- Holland, R.L., and Brown, M.C. (1981). Nerve growth in botulinum toxin poisoned muscles. *Neuroscience* *6*, 1167–1179.
- Hubbard, K., Beske, P., Lyman, M., and McNutt, P. (2015). Functional Evaluation of Biological Neurotoxins in Networked Cultures of Stem Cell-derived Central Nervous System Neurons. *J. Vis. Exp.*
- Jabbari, B. (2016). History of Botulinum Toxin Treatment in Movement Disorders. *Tremor Hyperkinetic Mov.* *6*, 394.
- Jenkinson, S.P., Grandgirard, D., Heidemann, M., Tschertter, A., Avondet, M.-A., and Leib, S.L. (2017). Embryonic Stem Cell-Derived Neurons Grown on Multi-Electrode Arrays as a Novel In vitro Bioassay for the Detection of Clostridium botulinum Neurotoxins. *Front. Pharmacol.* *8*.
- Jones, R.G.A., Ochiai, M., Liu, Y., Ekong, T., and Sesardic, D. (2008). Development of improved SNAP25 endopeptidase immuno-assays for botulinum type A and E toxins. *J. Immunol. Methods* *329*, 92–101.
- Kalb, S.R., Baudys, J., Raphael, B.H., Dykes, J.K., Lúquez, C., Maslanka, S.E., and Barr, J.R. (2015). Functional Characterization of Botulinum Neurotoxin Serotype H as a Hybrid of Known Serotypes F and A (BoNT F/A). *Anal. Chem.* *87*, 3911–3917.

- Kang, M., Han, A., Kim, D., Seidle, T., Lim, K.-M., and Bae, S. (2018). Mental Stress from Animal Experiments: a Survey with Korean Researchers. *Toxicol. Res.* *34*, 75–81.
- Keller, J.E., Cai, F., and Neale, E.A. (2004). Uptake of Botulinum Neurotoxin into Cultured Neurons. *Biochemistry* *43*, 526–532.
- Kim, H., Park, H.J., Choi, H., Chang, Y., Park, H., Shin, J., Kim, J., Lengner, C.J., Lee, Y.K., and Kim, J. (2019). Modeling G2019S-LRRK2 Sporadic Parkinson's Disease in 3D Midbrain Organoids. *Stem Cell Rep.* *12*, 518–531.
- Kim, J., Koo, B.-K., and Knoblich, J.A. (2020). Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *21*, 571–584.
- Kiris, E., Nuss, J.E., Burnett, J.C., Kota, K.P., Koh, D.C., Wanner, L.M., Torres-Melendez, E., Gussio, R., Tessarollo, L., and Bavari, S. (2011). Embryonic stem cell-derived motoneurons provide a highly sensitive cell culture model for botulinum neurotoxin studies, with implications for high-throughput drug discovery. *Stem Cell Res.* *6*, 195–205.
- Kiris, E., Kota, K.P., Burnett, J.C., Soloveva, V., Kane, C.D., and Bavari, S. (2014). Recent developments in cell-based assays and stem cell technologies for botulinum neurotoxin research and drug discovery. *Expert Rev. Mol. Diagn.* *14*, 153–168.
- Kirkeby, A., Grealish, S., Wolf, D.A., Nelander, J., Wood, J., Lundblad, M., Lindvall, O., and Parmar, M. (2012). Generation of Regionally Specified Neural Progenitors and Functional Neurons from Human Embryonic Stem Cells under Defined Conditions. *Cell Rep.* *1*, 703–714.
- Kriks, S., Shim, J.-W., Piao, J., Ganat, Y.M., Wakeman, D.R., Xie, Z., Carrillo-Reid, L., Auyeung, G., Antonacci, C., Buch, A., et al. (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature*.
- Kroken, A.R., Blum, F.C., Zuverink, M., and Barbieri, J.T. (2017). Entry of Botulinum Neurotoxin Subtypes A1 and A2 into Neurons. *Infect. Immun.* *85*.
- Kuijlaars, J., Oyelami, T., Diels, A., Rohrbacher, J., Versweyveld, S., Meneghello, G., Tuefferd, M., Verstraelen, P., Detrez, J.R., Verschuuren, M., et al. (2016). Sustained synchronized neuronal network activity in a human astrocyte co-culture system. *Sci. Rep.* *6*.
- Kwak, C.H., Hanna, P.A., and Jankovic, J. (2000). Botulinum Toxin in the Treatment of Tics. *Arch. Neurol.* *57*, 1190.
- Lacy, D.B., Tepp, W., Cohen, A.C., DasGupta, B.R., and Stevens, R.C. (1998). Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat. Struct. Biol.* *5*, 898–902.
- Lamanna, C., Eklund, H.W., and McElroy, O.E. (1946). Botulinum Toxin (Type A); Including a Study of Shaking with Chloroform as a Step in the Isolation Procedure. *J. Bacteriol.* *52*, 1–13.
- Lefort, N., Feyeux, M., Bas, C., Féraud, O., Bennaceur-Griscelli, A., Tachdjian, G., Peschanski, M., and Perrier, A.L. (2008). Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nat. Biotechnol.* *26*, 1364–1366.

- Lin, J.Y., Knutsen, P.M., Muller, A., Kleinfeld, D., and Tsien, R.Y. (2013). ReaChR: a red-shifted variant of channelrhodopsin enables deep transcranial optogenetic excitation. *Nat. Neurosci.* *16*, 1499–1508.
- Liu, C., Oikonomopoulos, A., Sayed, N., and Wu, J.C. (2018). Modeling human diseases with induced pluripotent stem cells: from 2D to 3D and beyond. *Development* *145*, dev156166.
- Liu, G., David, B.T., Trawczynski, M., and Fessler, R.G. (2020). Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Rev. Rep.* *16*, 3–32.
- Liu, Q., Sinnen, B.L., Boxer, E.E., Schneider, M.W., Grybko, M.J., Buchta, W.C., Gibson, E.S., Wysoczynski, C.L., Ford, C.P., Gottschalk, A., et al. (2019). A Photoactivatable Botulinum Neurotoxin for Inducible Control of Neurotransmission. *Neuron* *101*, 863-875.e6.
- Ma, L., Hu, B., Liu, Y., Vermilyea, S.C., Liu, H., Gao, L., Sun, Y., Zhang, X., and Zhang, S.-C. (2012). Human Embryonic Stem Cell-Derived GABA Neurons Correct Locomotion Deficits in Quinolinic Acid-Lesioned Mice. *Cell Stem Cell* *10*, 455–464.
- Mahrhold, S., Rummel, A., Bigalke, H., Davletov, B., and Binz, T. (2006). The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves. *FEBS Lett.* *580*, 2011–2014.
- Maignel-Ludop, J., Huchet, M., and Krupp, J. (2017). Botulinum Neurotoxins Serotypes A and B induce paralysis of mouse striated and smooth muscles with different potencies. *Pharmacol. Res. Perspect.* *5*, e00289.
- Marteyn, A., Maury, Y., Gauthier, M.M., Lecuyer, C., Vernet, R., Denis, J.A., Pietu, G., Peschanski, M., and Martinat, C. (2011). Mutant Human Embryonic Stem Cells Reveal Neurite and Synapse Formation Defects in Type 1 Myotonic Dystrophy. *Cell Stem Cell* *8*, 434–444.
- Martyn, J.A.J., Fagerlund, M.J., and Eriksson, L.I. (2009). Basic principles of neuromuscular transmission. *Anaesthesia* *64*, 1–9.
- Maslanka, S.E., Lúquez, C., Dykes, J.K., Tepp, W.H., Pier, C.L., Pellett, S., Raphael, B.H., Kalb, S.R., Barr, J.R., Rao, A., et al. (2016). A Novel Botulinum Neurotoxin, Previously Reported as Serotype H, Has a Hybrid-Like Structure With Regions of Similarity to the Structures of Serotypes A and F and Is Neutralized With Serotype A Antitoxin. *J. Infect. Dis.* *213*, 379–385.
- Masuyer, G., Zhang, S., Barkho, S., Shen, Y., Henriksson, L., Košenina, S., Dong, M., and Stenmark, P. (2018). Structural characterisation of the catalytic domain of botulinum neurotoxin X - high activity and unique substrate specificity. *Sci. Rep.* *8*.
- Mateizel, I., De Temmerman, N., Ullmann, U., Cauffman, G., Sermon, K., Van de Velde, H., De Rycke, M., Degreef, E., Devroey, P., Liebaers, I., et al. (2006). Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Hum. Reprod.* *21*, 503–511.
- Maury, Y., Côme, J., Piskorowski, R.A., Salah-Mohellibi, N., Chevaleyre, V., Peschanski, M., Martinat, C., and Nedelec, S. (2015). Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes. *Nat. Biotechnol.* *33*, 89.

McNutt, P., Beske, P., and Thirunavukkarsu, N. (2015). Cell-Based Assays for Neurotoxins. In *Biological Toxins and Bioterrorism*, P. Gopalakrishnakone, M. Balali-Mood, L. Llewellyn, and B.R. Singh, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 247–271.

Merkle, F.T., Ghosh, S., Kamitaki, N., Mitchell, J., Avior, Y., Mello, C., Kashin, S., Mekhoubad, S., Ilic, D., Charlton, M., et al. (2017). Human pluripotent stem cells recurrently acquire and expand dominant negative P53 mutations. *Nature* *545*, 229–233.

Meunier, F.A., Schiavo, G., and Molgó, J. (2002). Botulinum neurotoxins: from paralysis to recovery of functional neuromuscular transmission. *J. Physiol.-Paris* *96*, 105–113.

Miller, J.D., Ganat, Y.M., Kishinevsky, S., Bowman, R.L., Liu, B., Tu, E.Y., Mandal, P.K., Vera, E., Shim, J., Kriks, S., et al. (2013). Human iPSC-Based Modeling of Late-Onset Disease via Progerin-Induced Aging. *Cell Stem Cell* *13*, 691–705.

Miranda, C.C., and Cabral, J.M.S. (2020). Organoids for cell therapy and drug discovery. In *Precision Medicine for Investigators, Practitioners and Providers*, (Elsevier), pp. 461–471.

Mittal, S.O., Machado, D., Richardson, D., Dubey, D., and Jabbari, B. (2017). Botulinum Toxin in Parkinson Disease Tremor. *Mayo Clin. Proc.* *92*, 1359–1367.

Miyashita, S.-I., Sagane, Y., Suzuki, T., Matsumoto, T., Niwa, K., and Watanabe, T. (2016). “Non-Toxic” Proteins of the Botulinum Toxin Complex Exert In-vivo Toxicity. *Sci. Rep.* *6*.

Mohanty, S.K., and Lakshminarayanan, V. (2015). Optical techniques in optogenetics. *J. Mod. Opt.* *62*, 949–970.

Monheit, G.D., and Pickett, A. (2017). AbobotulinumtoxinA: A 25-Year History. *Aesthet. Surg. J.* *37*, S4–S11.

Montagni, E., Resta, F., Mascaro, A.L.A., and Pavone, F.S. (2019). Optogenetics in Brain Research: From a Strategy to Investigate Physiological Function to a Therapeutic Tool. *Photonics* *6*, 92.

Montal, M. (2010). Botulinum Neurotoxin: A Marvel of Protein Design. *Annu. Rev. Biochem.* *79*, 591–617.

Montecucco, C., Schiavo, G., Tugnoli, V., and de Grandis, D. (1996). Botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic applications. *Mol. Med. Today* *2*, 418–424.

Nepal, M.R., and Jeong, T.C. (2020). Alternative Methods for Testing Botulinum Toxin: Current Status and Future Perspectives. *Biomol. Ther.* *28*, 302–310.

Nicoleau, C., Varela, C., Bonnefond, C., Maury, Y., Bugi, A., Aubry, L., Viegas, P., Bourgois-Rocha, F., Peschanski, M., and Perrier, A.L. (2013). Embryonic stem cells neural differentiation qualifies the role of Wnt/ β -Catenin signals in human telencephalic specification and regionalization: Human ESC Telencephalic Differentiation. *STEM CELLS* *31*, 1763–1774.

Nicoleau, C., De Lamotte, J.D., Raban, E., Boude, E., Noirmain, F., and Krupp, J. (2018a). Assessment of multiple hiPSC-derived models for botulinum neurotoxin testing. *Toxicon* *156*, S85.

- Nicoleau, C., Donald, S., Pons, L., De Lamotte, J.D., Raban, E., Fonfria, E., and Krupp, J. (2018b). Translational value of hiPSC-derived models for botulinum neurotoxin research. *Toxicon* *156*, S84–S85.
- Nolbrant, S., Heuer, A., Parmar, M., and Kirkeby, A. (2017). Generation of high-purity human ventral midbrain dopaminergic progenitors for in vitro maturation and intracerebral transplantation. *Nat. Protoc.* *12*, 1962–1979.
- Odawara, A., Matsuda, N., Ishibashi, Y., Yokoi, R., and Suzuki, I. (2018). Toxicological evaluation of convulsant and anticonvulsant drugs in human induced pluripotent stem cell-derived cortical neuronal networks using an MEA system. *Sci. Rep.* *8*.
- Okano, H., Yasuda, D., Fujimori, K., Morimoto, S., and Takahashi, S. (2020). Ropinirole, a New ALS Drug Candidate Developed Using iPSCs. *Trends Pharmacol. Sci.* *41*, 99–109.
- Osaki, T., Uzel, S.G.M., and Kamm, R.D. (2020). On-chip 3D neuromuscular model for drug screening and precision medicine in neuromuscular disease. *Nat. Protoc.* *15*, 421–449.
- de Paiva, A., Meunier, F.A., Molgo, J., Aoki, K.R., and Dolly, J.O. (1999). Functional repair of motor endplates after botulinum neurotoxin type A poisoning: Biphasic switch of synaptic activity between nerve sprouts and their parent terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 3200–3205.
- Park, I.-H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., and Daley, G.Q. (2008). Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell* *134*, 877–886.
- Parsaik, A.K., Mascarenhas, S.S., Hashmi, A., Prokop, L.J., John, V., Okusaga, O., and Singh, B. (2016). Role of Botulinum Toxin in Depression: *J. Psychiatr. Pract.* *22*, 99–110.
- Peck, M., Smith, T., Anniballi, F., Austin, J., Bano, L., Bradshaw, M., Cuervo, P., Cheng, L., Derman, Y., Dorner, B., et al. (2017). Historical Perspectives and Guidelines for Botulinum Neurotoxin Subtype Nomenclature. *Toxins* *9*, 38.
- Pelletier-Cameron, A., and Cox, L. (2014). OnabotulinumtoxinA for the treatment of overactive bladder. *Res. Rep. Urol.* *79*.
- Pellett, S. (2013). Progress in Cell Based Assays for Botulinum Neurotoxin Detection. In *Botulinum Neurotoxins*, A. Rummel, and T. Binz, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 257–285.
- Pellett, S., Tepp, W.H., Clancy, C.M., Borodic, G.E., and Johnson, E.A. (2007). A neuronal cell-based botulinum neurotoxin assay for highly sensitive and specific detection of neutralizing serum antibodies. *FEBS Lett.* *581*, 4803–4808.
- Pellett, S., Tepp, W.H., Scherf, J.M., Pier, C.L., and Johnson, E.A. (2015). Activity of botulinum neurotoxin type D (strain 1873) in human neurons. *Toxicon* *101*, 63–69.

- Pellett, S., Tepp, W.H., and Johnson, E.A. (2019). Botulinum neurotoxins A, B, C, E, and F preferentially enter cultured human motor neurons compared to other cultured human neuronal populations. *FEBS Lett.*
- Peng, L., Tepp, W.H., Johnson, E.A., and Dong, M. (2011). Botulinum Neurotoxin D Uses Synaptic Vesicle Protein SV2 and Gangliosides as Receptors. *PLoS Pathog.* *7*, e1002008.
- Peng, L., Berntsson, R.P.-A., Tepp, W.H., Pitkin, R.M., Johnson, E.A., Stenmark, P., and Dong, M. (2012). Botulinum neurotoxin D-C uses synaptotagmin I and II as receptors, and human synaptotagmin II is not an effective receptor for type B, D-C and G toxins. *J. Cell Sci.* *125*, 3233–3242.
- Peng Chen, Z., Morris, J., Rodriguez, R., Shukla, A., Tapia-Núñez, J., and Okun, M. (2012). Emerging Opportunities for Serotypes of Botulinum Neurotoxins. *Toxins* *4*, 1196–1222.
- Pier, C.L., Chen, C., Tepp, W.H., Lin, G., Janda, K.D., Barbieri, J.T., Pellett, S., and Johnson, E.A. (2011). Botulinum neurotoxin subtype A2 enters neuronal cells faster than subtype A1. *FEBS Lett.* *585*, 199–206.
- Pirazzini, M., Rossetto, O., Eleopra, R., and Montecucco, C. (2017). Botulinum Neurotoxins: Biology, Pharmacology, and Toxicology. *Pharmacol. Rev.* *69*, 200–235.
- Pomeshchik, Y., Klementieva, O., Gil, J., Martinsson, I., Hansen, M.G., de Vries, T., Sancho-Balsells, A., Russ, K., Savchenko, E., Collin, A., et al. (2020). Human iPSC-Derived Hippocampal Spheroids: An Innovative Tool for Stratifying Alzheimer Disease Patient-Specific Cellular Phenotypes and Developing Therapies. *Stem Cell Rep.* *15*, 256–273.
- Poulain, B., and Humeau, Y. (2003). Le mode d'action des neurotoxines botuliques: aspects pathologiques, cellulaires et moléculaires. *Ann. Réadapt. Médecine Phys.* *46*, 265–275.
- Purkiss, J.R., Friis, L.M., Doward, S., and Quinn, C.P. (2001). Clostridium botulinum Neurotoxins Act with a Wide Range of Potencies on SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. *NeuroToxicology* *22*, 447–453.
- Rasooly, R., and Do, P.M. (2008). Development of an In Vitro Activity Assay as an Alternative to the Mouse Bioassay for Clostridium botulinum Neurotoxin Type A. *Appl. Environ. Microbiol.* *74*, 4309–4313.
- Ratni, H., Ebeling, M., Baird, J., Bendels, S., Bylund, J., Chen, K.S., Denk, N., Feng, Z., Green, L., Guerard, M., et al. (2018). Discovery of Risdiplam, a Selective Survival of Motor Neuron-2 (*SMN2*) Gene Splicing Modifier for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy (SMA). *J. Med. Chem.* *61*, 6501–6517.
- Ray, P. (1993). Botulinum toxin a inhibits acetylcholine release from cultured neurons in vitro. *Vitro Cell. Dev. Biol. - Anim.* *29*, 456–460.
- Restani, L., Giribaldi, F., Manich, M., Bercsenyi, K., Menendez, G., Rossetto, O., Caleo, M., and Schiavo, G. (2012). Botulinum Neurotoxins A and E Undergo Retrograde Axonal Transport in Primary Motor Neurons. *PLoS Pathog.* *8*, e1003087.

- Rhéaume, C., Cai, B., Wang, J., Fernández-Salas, E., Aoki, K., Francis, J., and Broide, R. (2015). A Highly Specific Monoclonal Antibody for Botulinum Neurotoxin Type A-Cleaved SNAP25. *Toxins* 7, 2354–2370.
- Richards, D.J., Li, Y., Kerr, C.M., Yao, J., Beeson, G.C., Coyle, R.C., Chen, X., Jia, J., Damon, B., Wilson, R., et al. (2020). Human cardiac organoids for the modelling of myocardial infarction and drug cardiotoxicity. *Nat. Biomed. Eng.* 4, 446–462.
- Rossetto, O., Pirazzini, M., and Montecucco, C. (2014). Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 535–549.
- Rummel, A., Karnath, T., Henke, T., Bigalke, H., and Binz, T. (2004). Synaptotagmins I and II Act as Nerve Cell Receptors for Botulinum Neurotoxin G. *J. Biol. Chem.* 279, 30865–30870.
- Rummel, A., Eichner, T., Weil, T., Karnath, T., Gutcaits, A., Mahrhold, S., Sandhoff, K., Proia, R.L., Acharya, K.R., Bigalke, H., et al. (2007). Identification of the protein receptor binding site of botulinum neurotoxins B and G proves the double-receptor concept. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 359–364.
- Rummel, A., Häfner, K., Mahrhold, S., Darashchonak, N., Holt, M., Jahn, R., Beermann, S., Karnath, T., Bigalke, H., and Binz, T. (2009). Botulinum neurotoxins C, E and F bind gangliosides via a conserved binding site prior to stimulation-dependent uptake with botulinum neurotoxin F utilising the three isoforms of SV2 as second receptor. *J. Neurochem.* 110, 1942–1954.
- Rust, A., Doran, C., Hart, R., Binz, T., Stickings, P., Sesardic, D., Peden, A.A., and Davletov, B. (2017). A Cell Line for Detection of Botulinum Neurotoxin Type B. *Front. Pharmacol.* 8.
- Sampaziotis, F., de Brito, M.C., Madrigal, P., Bertero, A., Saeb-Parsy, K., Soares, F.A.C., Schruppf, E., Melum, E., Karlsen, T.H., Bradley, J.A., et al. (2015). Cholangiocytes derived from human induced pluripotent stem cells for disease modeling and drug validation. *Nat. Biotechnol.* 33, 845–852.
- Satriyasa, B.K. (2019). Botulinum toxin (Botox) A for reducing the appearance of facial wrinkles: a literature review of clinical use and pharmacological aspect. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol. Volume* 12, 223–228.
- Schenke, M., Schjeide, B.-M., Püschel, G.P., and Seeger, B. (2020). Analysis of Motor Neurons Differentiated from Human Induced Pluripotent Stem Cells for the Use in Cell-Based Botulinum Neurotoxin Activity Assays. *Toxins* 12, 276.
- Scherf, J.M., Hu, X.S., Tepp, W.H., Ichtchenko, K., Johnson, E.A., and Pellett, S. (2014). Analysis of gene expression in induced pluripotent stem cell-derived human neurons exposed to botulinum neurotoxin A subtype 1 and a type A atoxic derivative. *PLoS One* 9, e111238.
- Schiavo, G., Santucci, A., Dasgupta, B.R., Mehta, P.P., Jontes, J., Benfenati, F., Wilson, M.C., and Montecucco, C. (1993). Botulinum neurotoxins serotypes A and E cleave SNAP-25 at distinct COOH-terminal peptide bonds. *FEBS Lett.* 335, 99–103.
- Schiavo, G., Malizio, C., Trimble, W.S., Polverino de Laureto, P., Milan, G., Sugiyama, H., Johnson, E.A., and Montecucco, C. (1994). Botulinum G neurotoxin cleaves VAMP/synaptobrevin at a single Ala-Ala peptide bond. *J. Biol. Chem.* 269, 20213–20216.

- Schiavo, G., Matteoli, M., and Montecucco, C. (2000). Neurotoxins Affecting Neuroexocytosis. *Physiol. Rev.* *80*, 717–766.
- Schmitt, J., Karalewitz, A., Benefield, D.A., Mushrush, D.J., Pruitt, R.N., Spiller, B.W., Barbieri, J.T., and Lacy, D.B. (2010). Structural Analysis of Botulinum Neurotoxin Type G Receptor Binding. *Biochemistry* *49*, 5200–5205.
- Schnaar, R.L. (2016). Gangliosides of the Vertebrate Nervous System. *J. Mol. Biol.* *428*, 3325–3336.
- Sellin, L.C. (1981). The action of botulinum toxin at the neuromuscular junction. *Med. Biol.* *59*, 11–20.
- Sesardic, D., Leung, T., and Gaines Das, R. (2003). Role for standards in assays of botulinum toxins: international collaborative study of three preparations of botulinum type A toxin. *Biologicals* *31*, 265–276.
- Shi, Y., Kirwan, P., Smith, J., Robinson, H.P.C., and Livesey, F.J. (2012). Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. *Nat. Neurosci.* *15*, 477–486.
- Shi, Y., Inoue, H., Wu, J.C., and Yamanaka, S. (2017). Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat. Rev. Drug Discov.* *16*, 115–130.
- Shibasaki, M., Davis, S.L., Cui, J., Low, D.A., Keller, D.M., and Crandall, C.G. (2009). Botulinum toxin abolishes sweating via impaired sweat gland responsiveness to exogenous acetylcholine. *Br. J. Dermatol.* *161*, 757–761.
- Simpson, L.L. (1974). Studies on the binding of botulinum toxin type a to the rat phrenic nerve-hemidiaphragm preparation. *Neuropharmacology* *13*, 683–691.
- Simpson, L.L. (2004). IDENTIFICATION OF THE MAJOR STEPS IN BOTULINUM TOXIN ACTION. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *44*, 167–193.
- Singh, B.R., and Kukreja, R. (2015). The botulinum toxin as a therapeutic agent: molecular and pharmacological insights. *Res. Rep. Biochem.* *173*.
- Singh, R.N., Ottesen, E.W., and Singh, N.N. (2020). The First Orally Deliverable Small Molecule for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy. *Neurosci. Insights* *15*, 263310552097398.
- Smith, T.J., Lou, J., Geren, I.N., Forsyth, C.M., Tsai, R., LaPorte, S.L., Tepp, W.H., Bradshaw, M., Johnson, E.A., Smith, L.A., et al. (2005). Sequence Variation within Botulinum Neurotoxin Serotypes Impacts Antibody Binding and Neutralization. *Infect. Immun.* *73*, 5450–5457.
- Sommer, E.W., Sommer, H., and Meyer, K.F. (1926). The Purification of Botulinum Toxin. *J. Infect. Dis.* *39*, 345–345.
- Stahl, A.M., Ruthel, G., Torres-Melendez, E., Kenny, T.A., Panchal, R.G., and Bavari, S. (2007). Primary Cultures of Embryonic Chicken Neurons for Sensitive Cell-Based Assay of Botulinum Neurotoxin: Implications for Therapeutic Discovery. *J. Biomol. Screen.* *12*, 370–377.

- Stenmark, P., Dong, M., Dupuy, J., Chapman, E.R., and Stevens, R.C. (2010). Crystal Structure of the Botulinum Neurotoxin Type G Binding Domain: Insight into Cell Surface Binding. *J. Mol. Biol.* *397*, 1287–1297.
- Stern, Skiba, M., Dorner, M., Dorner, B., and von Berg (2018). Replacing the mouse bioassay for diagnostics and potency testing of botulinum neurotoxins – progress and challenges. *Berl Münch Tierärztl Wochensch.*
- Stett, A., Egert, U., Guenther, E., Hofmann, F., Meyer, T., Nisch, W., and Haemmerle, H. (2003). Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research. *Anal. Bioanal. Chem.* *377*, 486–495.
- Taapken, S.M., Nisler, B.S., Newton, M.A., Sampsell-Barron, T.L., Leonhard, K.A., McIntire, E.M., and Montgomery, K.D. (2011). Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* *29*, 313–314.
- Takahashi, T. (2019). Organoids for Drug Discovery and Personalized Medicine. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *59*, 447–462.
- Takebe, T., Zhang, B., and Radisic, M. (2017). Synergistic Engineering: Organoids Meet Organs-on-a-Chip. *Cell Stem Cell* *21*, 297–300.
- Tandon, H.K., Stratton, P., Sinaii, N., Shah, J., and Karp, B.I. (2019). Botulinum toxin for chronic pelvic pain in women with endometriosis: a cohort study of a pain-focused treatment. *Reg. Anesth. Pain Med.* *44*, 886–892.
- Tao, Y., and Zhang, S.-C. (2016). Neural Subtype Specification from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* *19*, 573–586.
- Tao, L., Peng, L., Berntsson, R.P.-A., Liu, S.M., Park, S., Yu, F., Boone, C., Palan, S., Beard, M., Chabrier, P.-E., et al. (2017). Engineered botulinum neurotoxin B with improved efficacy for targeting human receptors. *Nat. Commun.* *8*.
- Thomas Jr, C., Springer, P., Loeb, G., Berwaldnetter, Y., and Okun, L. (1972). A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells. *Exp. Cell Res.* *74*, 61–66.
- Thomson, J.A. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* *282*, 1145–1147.
- Tighe, A.P., and Schiavo, G. (2013). Botulinum neurotoxins: Mechanism of action. *Toxicon* *67*, 87–93.
- Trevan, J.W. (1927). The error of determination of toxicity. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Contain. Pap. Biol. Character* *101*, 483–514.
- Tsukamoto, K., Kohda, T., Mukamoto, M., Takeuchi, K., Ihara, H., Saito, M., and Kozaki, S. (2005). Binding of *Clostridium botulinum* Type C and D Neurotoxins to Ganglioside and Phospholipid: *NOVEL INSIGHTS INTO THE RECEPTOR FOR CLOSTRIDIAL NEUROTOXINS*. *J. Biol. Chem.* *280*, 35164–35171.

- Tulpule, A., Lensch, M.W., Miller, J.D., Austin, K., D'Andrea, A., Schlaeger, T.M., Shimamura, A., and Daley, G.Q. (2010). Knockdown of Fanconi anemia genes in human embryonic stem cells reveals early developmental defects in the hematopoietic lineage. *Blood* *115*, 3453–3462.
- Urbach, A. (2004). Modeling for Lesch-Nyhan Disease by Gene Targeting in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* *22*, 635–641.
- Urbach, A., and Benvenisty, N. (2009). Studying Early Lethality of 45,XO (Turner's Syndrome) Embryos Using Human Embryonic Stem Cells. *PLoS ONE* *4*, e4175.
- Verderio, C., Rossetto, O., Grumelli, C., Frassoni, C., Montecucco, C., and Matteoli, M. (2006). Entering neurons: botulinum toxins and synaptic vesicle recycling. *EMBO Rep.* *7*, 995–999.
- Völkner, M., Zschätzsch, M., Rostovskaya, M., Overall, R.W., Buskamp, V., Anastassiadis, K., and Karl, M.O. (2016). Retinal Organoids from Pluripotent Stem Cells Efficiently Recapitulate Retinogenesis. *Stem Cell Rep.* *6*, 525–538.
- Walker, T.J., and Dayan, S.H. (2014). Comparison and overview of currently available neurotoxins. *J. Clin. Aesthetic Dermatol.* *7*, 31–39.
- Waring, M.J., Arrowsmith, J., Leach, A.R., Leeson, P.D., Mandrell, S., Owen, R.M., Pairaudeau, G., Pennie, W.D., Pickett, S.D., Wang, J., et al. (2015). An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. *Nat. Rev. Drug Discov.* *14*, 475–486.
- Washbourne, P., Pellizzari, R., Baldini, G., Wilson, M.C., and Montecucco, C. (1997). Botulinum neurotoxin types A and E require the SNARE motif in SNAP-25 for proteolysis. *FEBS Lett.* *418*, 1–5.
- Welch, M.J., Purkiss, J.R., and Foster, K.A. (2000). Sensitivity of embryonic rat dorsal root ganglia neurons to Clostridium botulinum neurotoxins. *Toxicon* *38*, 245–258.
- Whitemarsh, R.C.M., Strathman, M.J., Chase, L.G., Stankewicz, C., Tepp, W.H., Johnson, E.A., and Pellett, S. (2012). Novel Application of Human Neurons Derived from Induced Pluripotent Stem Cells for Highly Sensitive Botulinum Neurotoxin Detection. *Toxicol. Sci.* *126*, 426–435.
- Whitemarsh, R.C.M., Tepp, W.H., Bradshaw, M., Lin, G., Pier, C.L., Scherf, J.M., Johnson, E.A., and Pellett, S. (2013). Characterization of Botulinum Neurotoxin A Subtypes 1 Through 5 by Investigation of Activities in Mice, in Neuronal Cell Cultures, and In Vitro. *Infect. Immun.* *81*, 3894–3902.
- Wilder-Kofie, T.D., Lúquez, C., Adler, M., Dykes, J.K., Coleman, J.D., and Maslanka, S.E. (2011). An alternative in vivo method to refine the mouse bioassay for botulinum toxin detection. *Comp. Med.* *61*, 235–242.
- Wilkinson, D.C., Alva-Ornelas, J.A., Sucre, J.M.S., Vijayaraj, P., Durra, A., Richardson, W., Jonas, S.J., Paul, M.K., Karumbayaram, S., Dunn, B., et al. (2017). Development of a Three-Dimensional Bioengineering Technology to Generate Lung Tissue for Personalized Disease Modeling: Three-Dimensional Bioengineered Lung Tissue. *STEM CELLS Transl. Med.* *6*, 622–633.

- Williamson, L.C., Halpern, J.L., Montecucco, C., Brown, J.E., and Neale, E.A. (1996). Clostridial Neurotoxins and Substrate Proteolysis in Intact Neurons: BOTULINUM NEUROTOXIN C ACTS ON SYNAPTOSOMAL-ASSOCIATED PROTEIN OF 25 kDa. *J. Biol. Chem.* *271*, 7694–7699.
- Willjes, G., Mahrhold, S., Strotmeier, J., Eichner, T., Rummel, A., and Binz, T. (2013). Botulinum Neurotoxin G Binds Synaptotagmin-II in a Mode Similar to That of Serotype B: Tyrosine 1186 and Lysine 1191 Cause Its Lower Affinity. *Biochemistry* *52*, 3930–3938.
- Woudstra, C., Skarin, H., Anniballi, F., Fenicia, L., Bano, L., Drigo, I., Koene, M., Båyon-Auboyer, M.-H., Buffereau, J.-P., De Medici, D., et al. (2012). Neurotoxin Gene Profiling of Clostridium botulinum Types C and D Native to Different Countries within Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* *78*, 3120–3127.
- Yadirgi, G., Stickings, P., Rajagopal, S., Liu, Y., and Sesardic, D. (2017). Immuno-detection of cleaved SNAP-25 from differentiated mouse embryonic stem cells provides a sensitive assay for determination of botulinum A toxin and antitoxin potency. *J. Immunol. Methods* *451*, 90–99.
- Yagi, T., Ito, D., Okada, Y., Akamatsu, W., Nihei, Y., Yoshizaki, T., Yamanaka, S., Okano, H., and Suzuki, N. (2011). Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 4530–4539.
- Yamamoto, H., Ida, T., Tsutsuki, H., Mori, M., Matsumoto, T., Kohda, T., Mukamoto, M., Goshima, N., Kozaki, S., and Ihara, H. (2012). Specificity of botulinum protease for human VAMP family proteins: Specificity of botulinum protease. *Microbiol. Immunol.* *56*, 245–253.
- Yamasaki, S., Binz, T., Hayashi, T., Szabo, E., Yamasaki, N., Eklund, M., Jahn, R., and Niemann, H. (1994). Botulinum Neurotoxin Type G Proteolyzes the Ala81-Ala82 Bond of Rat Synaptobrevin 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *200*, 829–835.
- Yao, G., Lam, K., Perry, K., Weisemann, J., Rummel, A., and Jin, R. (2017). Crystal Structure of the Receptor-Binding Domain of Botulinum Neurotoxin Type HA, Also Known as Type FA or H. *Toxins* *9*, 93.
- Yowler, B.C., Kensinger, R.D., and Schengrund, C.-L. (2002). Botulinum Neurotoxin A Activity Is Dependent upon the Presence of Specific Gangliosides in Neuroblastoma Cells Expressing Synaptotagmin I. *J. Biol. Chem.* *277*, 32815–32819.
- Yu, D.X., Di Giorgio, F.P., Yao, J., Marchetto, M.C., Brennand, K., Wright, R., Mei, A., Mchenry, L., Lisuk, D., Grasmick, J.M., et al. (2014). Modeling Hippocampal Neurogenesis Using Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rep.* *2*, 295–310.
- Yu, H., Li, M., Wang, W., and Wang, X. (2016). High throughput screening technologies for ion channels. *Acta Pharmacol. Sin.* *37*, 34–43.
- Yu, R.K., Tsai, Y.-T., Ariga, T., and Yanagisawa, M. (2011). Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides--an overview. *J. Oleo Sci.* *60*, 537–544.
- Zanetti, G., Sikorra, S., Rummel, A., Krez, N., Duregotti, E., Negro, S., Henke, T., Rossetto, O., Binz, T., and Pirazzini, M. (2017). Botulinum neurotoxin C mutants reveal different effects of syntaxin or SNAP-25 proteolysis on neuromuscular transmission. *PLOS Pathog.* *13*, e1006567.

Zhang, S., Masuyer, G., Zhang, J., Shen, Y., Lundin, D., Henriksson, L., Miyashita, S.-I., Martínez-Carranza, M., Dong, M., and Stenmark, P. (2017). Identification and characterization of a novel botulinum neurotoxin. *Nat. Commun.* *8*.

Zhang, W., Jiao, B., Zhou, M., Zhou, T., and Shen, L. (2016). Modeling Alzheimer's Disease with Induced Pluripotent Stem Cells: Current Challenges and Future Concerns. *Stem Cells Int.* *2016*, 1–12.

Article de recherche :

Optogenetically controlled human functional motor endplate for testing botulinum neurotoxins

Juliette Duchesne de Lamotte^{a,b}, Jérôme Polentes^b, Léa Lesueur^b, Pauline Feurgard^b, Camille Nicoleau^a, Anselme Perrier^c, Cécile Martinat^{b*}

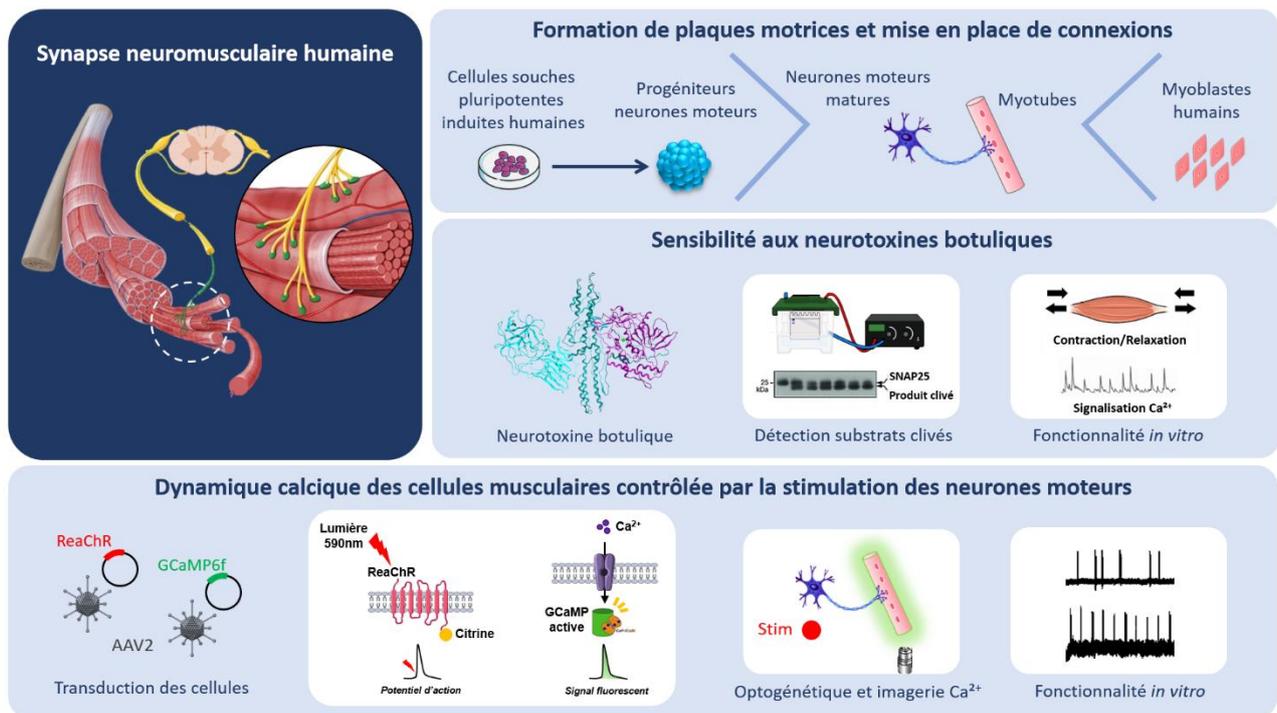


Figure 38. Résumé graphique des travaux de recherche

Formation de la plaque motrice et mise en place de connexions

La première partie de cette étude a consisté à élaborer un protocole optimal de coculture entre des neurones moteurs et des cellules musculaires humaines de sorte à modéliser une plaque motrice fonctionnelle *in vitro*. Après avoir généré une banque de cellules souches pluripotentes induites humaines de qualité grâce à un protocole automatisé d'amplification, nous nous sommes appuyés sur un protocole déjà établi au laboratoire afin de différencier des neurones moteurs à partir des CSPi humaines précédemment générées (Maury et al., 2015). Ce protocole permet de produire en une dizaine de jours des progéniteurs de neurones moteurs, qui peuvent ensuite maturer en neurones post-mitotiques matures pendant une trentaine de jours supplémentaires. Ces dérivés de CSPi possèdent alors des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de neurones moteurs

humains. La pureté de ces productions est importante, près de 80% des cellules étant des neurones moteurs coexprimant un marqueur neuronal (Tuj1) et le marqueur Islet1, un facteur de transcription nécessaire à la survie et à la spécification des neurones moteurs spinaux. En parallèle, nous avons choisi de travailler avec des myoblastes immortalisés humains (Mamchaoui et al., 2011), pour les cocultiver ensuite avec les neurones moteurs. L'analyse des caractéristiques phénotypiques des myoblastes a démontré qu'ils maturaient en myotubes et exprimaient les marqueurs myogénique (MF20, *Myosin 4*) et sarcomérique (SAA, *Sarcomeric alpha actinin*) en une quinzaine de jours. L'index de fusion de ces cellules, critère majeur de distinction de la maturation des myoblastes en myotubes est de 80%, révélateur du degré de myoblastes ayant fusionné en myotubes au cours de la différenciation terminale. La mise en coculture des deux populations cellulaires a mis en évidence la création de connexions entre les neurones moteurs et les myotubes, ainsi que la fonctionnalité (contractions et dynamique calcique) des myotubes innervés par les neurones moteurs. Le rôle de l'acétylcholine comme neurotransmetteur médiateur du couplage neurone-muscle a été confirmé par l'effet de la tubocurarine (antagoniste des récepteurs à l'ACh). L'ajout de tubocurarine a en effet, entraîné un arrêt immédiat des contractions des myotubes et du flux de calcium dans les myotubes. L'ensemble de nos résultats ont démontré nos capacités à reproduire partiellement en culture le développement d'une plaque motrice fonctionnelle *in vitro*.

Sensibilité du modèle *in vitro* de plaque motrice humaine aux BoNT

La suite de l'étude a consisté à évaluer la sensibilité de ce modèle *in vitro* de plaque motrice humaine à la toxine de référence choisie, la neurotoxine botulique recombinante A (rBoNT/A) produite par le laboratoire IPSEN. Cette toxine est connue pour cliver spécifiquement la protéine SNAP25 au niveau des terminaisons des neurones moteurs. En ce sens, nous avons réalisé plusieurs tests permettant de rendre compte de l'effet de la neurotoxine au niveau protéique (western blot) et au niveau fonctionnel (contractions et dynamique calcique des myotubes). L'évaluation du clivage de la SNAP25 par western blot a confirmé la sensibilité de la coculture à la rBoNT/A avec une sensibilité similaire à celle des neurones moteurs humains en monoculture établi au laboratoire I-Stem. Ces résultats prouvent ainsi que la mise en coculture des neurones moteurs n'impacte pas sur l'activité de la toxine et confirme que le système de coculture généré est pertinent pour l'étude des BoNT. Au niveau fonctionnel, la mesure de la contractilité des myotubes et de leur signal calcique a démontré l'effet inhibiteur de la neurotoxine, son caractère dose-dépendant, et le décours temporel

de son action. De façon intéressante, les résultats ont mis en évidence que la mesure de la signalisation calcique permettait d'observer un effet inhibiteur rapide de la rBoNT/A quelques heures seulement après traitement, alors que l'observation de l'inhibition des contractions des myotubes ne révèle cette activité de la neurotoxine que plusieurs heures après. La mesure de la signalisation calcique intracellulaire des myotubes représente ainsi un atout pour évaluer l'effet des toxines puisqu'elle permet de raccourcir l'analyse de la fonctionnalité et de s'affranchir des limitations techniques observées pour la mesure des contractions des myotubes.

Dynamique calcique des cellules musculaires contrôlée par la stimulation des neurones moteurs

La dernière partie de notre étude a porté sur le couplage entre activité calcique des myotubes et une stimulation induite des neurones moteurs dans notre modèle *in vitro* de plaque motrice humaine grâce à une approche optogénétique. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons choisi de substituer l'indicateur calcique synthétique (Cal520) utilisé jusqu'alors pour mesurer la signalisation calcique dans les myotubes pour un indicateur calcique génétiquement codé (GCaMP6f) de sorte à s'affranchir des inconvénients de l'indicateur synthétique, et également dans le but de mesurer l'activité calcique uniquement dans un seul type cellulaire, ici les myotubes. Dans un premier temps, nous avons défini les conditions permettant une exploitation optimale des technologies employées (outils optogénétiques, stimulation lumineuse, imagerie calcique) et de ressource cellulaire (transduction des neurones moteurs avec un optogène, le ReaChR, et des myotubes avec un indicateur calcique, la GCaMP6f). Une fois tous les outils en main, nous avons testé la fonctionnalité de notre système optogénétique, dont les résultats ont démontré la possibilité d'augmenter l'activité des neurones moteurs après stimulation lumineuse et d'entraîner une réponse modulable de l'activité des myotubes. Cette activité a également été inhibée ou à l'inverse activée par l'action de la tubocurarine ou du glutamate respectivement. Enfin, nous avons testé deux toxines produites par le laboratoire IPSEN, ayant des mécanismes d'action différents, notre toxine de référence (rBoNT/A) et une toxine modifiée (mBoNT). Les résultats ont révélé une différence de réponse fonctionnelle des myotubes suite au traitement à la même concentration de notre modèle *in vitro* de plaque motrice humaine avec l'une ou l'autre des BoNT. Nos résultats ont mis en évidence la haute sensibilité du système et la puissance plus forte et la rapidité d'action plus importante de la mBoNT comparée à la rBoNT/A. C'est à ma connaissance la première fois que deux BoNT sont

comparées sur un modèle humain fonctionnel de plaque motrice contrôlée *in vitro*.

Conclusions

Au cours de cette étude, nous avons élaboré un protocole de coculture optimal entre des neurones moteurs humains et des cellules musculaires humaines permettant de constituer un modèle *in vitro* de plaque motrice humaine dédié à l'étude des BoNT. Ce protocole a permis *in vitro* d'évaluer l'effet inhibiteur connu des BoNT sur la fonctionnalité synaptique des neurones moteurs, induisant une réponse inhibitrice au niveau des cellules musculaires innervées par les neurones moteurs. Nous avons également utilisé notre système de coculture pour déchiffrer le couplage entre la stimulation des neurones moteurs et l'enregistrement de l'activité des cellules musculaires, et évaluer fonctionnellement la sensibilité de notre modèle de plaque motrice à deux BoNT possédant des mécanismes d'action différents. Cette étude a ainsi permis d'apporter la preuve de concept du développement d'un nouveau test *in vitro* pour mesurer l'activité des BoNT sur un modèle humain fonctionnel modèle de la JNM. Ce modèle ouvre également de nouvelles perspectives pour étudier les mécanismes et les propriétés de tout un panel de différentes BoNT mais aussi d'autres molécules ciblant les JNM pour le développement de nouveaux médicaments, et enfin pour modéliser différentes maladies neuromusculaires comme par exemple la spasticité et les dyskinésies.

Ce travail fait l'objet d'un article de recherche en cours de préparation, dont le processus de soumission devrait débuter dans les prochaines semaines.

Optogenetically controlled human functional motor endplate for testing botulinum neurotoxins

Juliette Duchesne de Lamotte^{a,b}, Jérôme Polentes^b, Léa Lesueur^b, Pauline Feurgard^b, Camille Nicoleau^a, Anselme Perrier^c, Cécile Martinat^{b*}

*Correspondence: cmartinat@istem.fr

^aIPSEN Innovation, 91940 Les Ulis, France

^bUniversité Evry-Paris Saclay/INSERM UMR861, I-STEM, 91100 Corbeil-Essonnes, France

^cUniversité Paris Saclay/CEA/CNRS UMR9199, Laboratoire des Maladies Neurodégénératives : mécanismes, thérapies, imagerie, 92265 Fontenay-aux-Roses, France

Abstract

Background: The lack of physiologically relevant and predictive cell-based assays is one of the major obstacles for testing and developing botulinum neurotoxins (BoNTs) therapeutics. Human induced Pluripotent Stem Cells (hiPSCs)-derivatives now offer the opportunity to improve the relevance of cellular models and thus the translational value of preclinical data.

Methods: We investigated the potential of hiPSC-derived motor neurons (hMNs) optical stimulation combined with calcium imaging in cocultured muscle cells activity to investigate BoNT-sensitivity of an *in vitro* model of human muscle-nerve system.

Results: Functional muscle-nerve coculture system was developed using hMNs and human immortalized skeletal muscle cells. Our results demonstrated that hMNs can innervate myotubes and induce contractions and calcium transient in muscle cells, generating an *in vitro* human motor endplate showing dose-dependent sensitivity to BoNTs intoxication. The implementation of optogenetics combined with live calcium imaging allows to monitor the impact of BoNTs intoxication on synaptic transmission in human motor endplate model.

Conclusions: Altogether, our findings demonstrate the promise of optogenetically hiPSC-derived controlled muscle-nerve system for pharmaceutical BoNTs testing and development.

Key Words: Human induced pluripotent stem cells, Motor endplate, Functional, Botulinum neurotoxins, Calcium indicators, Optogenetics

Background

Botulinum neurotoxins (BoNTs), produced by various *Clostridium* bacteria, are among the most potent neurotoxins known and exposure induces flaccid muscular paralysis [1–4]. Since the 1980s, despite their toxicity and because small doses produce a prolonged action at the synapses, BoNTs have been approved for therapy of many neuromuscular and neurological disorders characterized by excessive muscle tone or abnormal muscle contractions [5]. Based upon the use of neutralizing antibodies, eight different serotypes of BoNT have been reported, from BoNT/A to BoNT/H. Serotypes differ in their toxicity, molecular site of action, efficiency in terms of muscle paralysis, duration of action and specific affinity for their targets [6–11]. Although each serotype has its particular characteristics, at the neuromuscular junction (NMJ), they all induce an inhibition of the ACh release into the synaptic cleft, leading to denervation and weakening of muscle contractions.

Despite the great diversity of natural BoNTs, only serotypes A and B have reached the market so far. Currently, there are four formulations of BoNTs approved by the US Food and Drug Administration (FDA) for several clinical or aesthetics indications [12,13]. Several dozen clinical trials are underway to study the efficacy and safety of BoNTs for various clinical conditions [13]. The increasing understanding of the biology of the neurotoxins and the availability of highly differentiated toxin serotypes as well as engineered serotypes offers the prospect in coming years of expanding this therapeutic benefit and extending it to a greater range of clinical conditions. Nonetheless, the relatively low throughput and poor physiological relevance of assays that are used so far in rodent animals hamper clinical translation of BoNTs research. A major issue is in particular species-specificities of BoNTs activity; for example the potency of BoNT/B is higher in mice than humans owing to a residue difference in the synaptotagmin 2 (SYT2) receptor resulting to a lower binding affinity of BoNT/B for human SYT2 [14]. In addition, the relatively high number of animals required for these studies raises ethical issues [15–17].

In the past decade, the field has moved towards fully humanized *in vitro* models of the neuromuscular junction (NMJ) hoping to overcome both issue of throughput and relevance of rodent models. In this context Yamanaka's and Thomson's [18–20] first description of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) in 2007 was a major breakthrough. Human iPSCs are capable of unlimited self-renewal and can differentiate into any cell derivatives of the three germ layers. Because they are human by origin hiPSC-derived NMJ has the potential to overcome both specie-specificities

of BoNTs activity and to some extent poor throughput of assays in rodent. Two decades of research has provided differentiation protocols to generate the cell types involved in the NMJ including hiPSC-derived motor neurons and skeletal muscle cells. Formation of functional NMJ between hiPSC-derived motor neurons (hMNs) and rodent skeletal muscle [21], or primary human skeletal muscle [22–24], or even hiPSC-derived skeletal muscle [25,26] has recently been described. In this context several studies assessed BoNTs activity on hMNs using biochemical assays that confirmed cleavage of hMN's synaptosomal-associated protein 25 KDa (SNAP25) by BoNTs [27–30]. Our group, recently described a human motor endplate system where hMNs and immortalized human muscle cells were cocultured in the same well and showed that the system is sensitive to BoNT/A, evidencing reduced/blockade of muscle cells contractions exposed to BoNT [31]. Traditionally electrical stimulation (electrophysiology) is used to monitor and stimulate excitable cells but recent advance in optical-stimulation and calcium imaging methods open new avenue for the precise control and recording of individual compartment of NMJ modeled *in vitro*.

In the present study, we built an *in vitro* model of humanized motor endplate using motor neurons derived from hiPSCs and immortalized human skeletal muscle cells. Our results confirmed that hMNs could innervate human muscle cells *in vitro* and generate a functional motor endplate model sensitive to BoNTs as identified by the measurement of contractions and intracellular calcium oscillations in skeletal muscle cells. In order to gain control on the pre-synaptic activity of our motor endplate model, we used optogenetics in hMNs. For this purpose, a red-shifted variant of channelrhodopsin, ReaChR, was expressed to generate blue-light sensitive hMNs and thus gain optical control over their electrical activity as previously described [32–34]. We expressed GCaMP6f, a fluorescence fast genetically encoded calcium indicator already known for its signal quality in myotubes [35], in our human muscular cells to monitor their activity in basal condition and upon drug or BoNTs exposure. Overall, we used our system to provide proof of concept of the coupling between hMN stimulation and muscle cell activity and to evaluate the sensitivity of humanized motor endplate to different BoNTs utilizing different mechanisms of action.

Material and methods

Human iPSCs culture and amplification

The WTSli020 hiPSC line from fibroblasts of dermis of a healthy female was provided by EBiSC (European Bank for induced pluripotent Stem Cells) was cultured in feeder-free conditions using Vitronectin-coated culture vessels (VTN-N; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and Essential 8 Flex medium (Gibco, Grand-Island, NY, USA) supplemented with Penicillin/Streptomycin (1:1000 PenStrep; Gibco). Briefly, cells were thawed and manually expanded over five supplementary passages. For manual passaging, StemPro EZPassage tool (Thermo Fisher Scientific) was used. The automated cell culture system Compact Select (Sartorius, Gottingen, Germany) was then used to generate a working cell bank using 0.25 mM EDTA (Thermo Fisher Scientific) in Phosphate Buffered Saline (PBS; Gibco) without calcium or magnesium for cell passaging. Finally, cells were dispensed into cryovials using the automated system Fill-It (Sartorius) and frozen using CryoMed Controlled-Rate Freezer (Thermo Fisher Scientific). Quality controls (mycoplasma detection, pluripotency marker expression, genomic integrity) were performed before and after amplification.

Flow cytometry

Cells were detached using TrypLE (Thermo Fisher Scientific) and resuspended at 100 000 cells per 50 μ L in staining buffer containing PBS with 2 mM EDTA and Bovine Serum Albumin (0.5% BSA; Gibco). Antibodies, TRA1-81-AF647 (BioLegend, San Diego, CA, USA) and SSEA4-PE (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) were added at appropriate concentrations (according to the manufacturer's instructions) and incubated during 30 min at 4°C in the dark. Cells were analyzed on a MACSQuant flow cytometer (Miltenyi Biotec) with FlowJo software (Tree Star, San Carlos, CA, USA). A total of 20 000 events were recorded for each sample.

Genomic integrity

Before passaging the cells, the cell culture supernatants of hiPSCs WTSli020-B cultures were collected and transferred directly into a safe-lock tube. The culture medium must have been in contact with the cells for at least 24h. The supernatant samples containing cells were processed by Stemgenomics (St Eloi University Hospital Center, Montpellier, France) and analyzed using iCS-digital PCS test which detects by digital PCR more than 90% of recurrent genomic abnormalities in hPSCs supernatant (iCS-digital PSC 24-probes kit).

Differentiation of hMNs progenitors from hiPSCs

Human iPSC embryoid body-based differentiation was performed as previously described by Maury et al. [36]. hiPSCs were dissociated with Accutase (Thermo Fisher Scientific) for 5 min at 37°C and resuspended in basal medium which is a mix between DMEM-F12 Glutamax/Neurobasal (1:1 ratio; Gibco), N2 supplement/B27 no vitamin A supplement (1:2 ratio; Gibco), β -mercaptoethanol (0.1% β -ME; Gibco) and PenStrep (0.1%; Gibco), supplemented with small molecules including ascorbic acid (0.5 μ M; Sigma-Aldrich), SB431542 (20 μ M; TOCRIS-BioTechne, Minneapolis, MN, USA), LDN193189 (0.2 μ M; Miltenyi Biotec), CHIR99021 (3 μ M; Miltenyi Biotec) and Y-27632 (10 μ M; STEMCELLS Technologies, Vancouver, Canada). Cells were seeded in suspension into T25 flask (Dutscher, Bernolsheim, France) to form embryoid bodies (EBs). During the entire culture process, small molecules were added at different timepoints including retinoic acid (0.1 μ M RA; Sigma-Aldrich), Smoothened Agonist (0.5 μ M SAG; STEMCELLS Technologies), Brain-Derived Neurotrophic Factor (10 ng/mL BDNF; PreproTech, Rocky Hill, NJ, USA) and γ -secretase inhibitor (10 μ M DAPT; STEMCELLS Technologies). Then, EBs were dissociated at DIV 10 (days *in vitro*) and hMNs progenitors were generated. Cells were finally dispensed into cryovials and frozen using CryoMed Controlled-Rate Freezer (Thermo Fisher Scientific). The differentiation proceeded according to the schema presented among the figures.

Human immortalized myoblasts culture

The human immortalized myoblasts cell line (AB1167c4, from fascia lata muscle of a healthy 20 years old male) was obtained from the MyoBank, Institute of Myology (Paris, France) [37]. Cells were seeded onto 96-well plate precoated with Collagen I (Thermo Fisher Scientific) at a concentration of 70 000 cells/cm² in the myogenic induction medium composed of a mix between Medium 199/Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) high glucose GlutaMAX (1:4 ratio; Gibco), Fetal Bovine Serum (20% FBS; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), fetuin (25 μ g/mL; Sigma-Aldrich), insulin (5 μ g/mL; Gibco), Dexamethasone (0.2 μ g/mL DXT; Sigma-Aldrich), Fibroblast Growth Factor (0.5 ng/mL FGF; STEMCELL Technologies), Epidermal Growth Factor (5 ng/mL EGF; STEMCELL Technologies) and gentamicin (0.1%; Gibco).

Coculture of human immortalized myoblasts and hMNs

Human immortalized myoblasts were seeded onto 96-well plate and incubated over 24h at 37°C within a 5% CO₂ environment in 96-well plate. The myogenic induction medium was replaced with

coculture medium which was a mix between 1:3 of myogenic differentiation medium and 2:3 of hMNs growth medium. The myogenic differentiation medium was composed of DMEM high glucose GlutaMAX (Gibco), gentamicin (1%; Gibco) and insulin (10 µg/mL; Gibco). The hMNs growth medium was composed of a basal medium which is a mix between DMEM-F12 Glutamax/Neurobasal (1:1 ratio; Gibco), N2 supplement/B27 no vitamin A supplement (1:2 ratio; Gibco), β-mercaptoethanol (0.1% β-ME; Gibco) and Penicillin/Streptomycin (0.1% PenStrep; Gibco), supplemented with small molecules including ascorbic acid (0.5 µM; Sigma-Aldrich), retinoic acid (0.1 µM; Sigma-Aldrich), Smoothened Agonist (0.5 µM SAG; STEMCELLS Technologies), Brain-Derived Neurotrophic Factor (10 ng/mL BDNF; PreproTech, Rocky Hill, NJ, USA), Glial-Derived Neurotrophic Factor (10 ng/mL GDNF; PreproTech), γ-secretase inhibitor (10 nM DAPT; STEMCELLS Technologies). Y-27632 (10 µM; STEMCELLS Technologies) was used only for the thawing. hMNs progenitors generated in 10 days by following the protocol previously described in the section "Differentiation of hMNs progenitors from hiPSCs", were present at a concentration of 90 000 cells/cm² and plated directly over the myoblasts and incubated at 37°C with 5% CO₂ for up to 15 days to mature and differentiate. Half of coculture medium was changed every 5 days.

Immunostaining

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min and further permeabilized and blocked with Triton X-100 (0.1%; Sigma-Aldrich) and BSA (2%; Gibco) in PBS (Gibco) for 30 min. Primary antibodies were then added and were incubated at 4°C overnight in PBS/BSA/Triton solution. Human iPSCs were labelled with Nanog (1:1000; Abcam, Cambridge, UK), Oct4 (1:400; Thermo Fisher Scientific), Sox2 (1:200; Thermo Fisher Scientific) and TRA1-60 (1:500; Abcam). Neurons were labelled with Tuj1 (1:1000; BioLegend), Islet1 (1:200; Neuromics, Edina, MN, USA), Synaptophysin (1:100 SYN; Abcam), Neurofilament H Non-Phosphorylated (1:200 SMI32; Abcam) and SNAP25 (1:1000; Sigma-Aldrich) antibodies. Myotubes were labelled with Rhodamine-Phalloidin (1:200; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), Myosin-Alexa Fluor 488 (1:500 MF20; Invitrogen) and Sarcomeric Alpha Actinin (1:200 SAA; Sigma-Aldrich) antibodies. The clusters of acetylcholine receptors were labelled with AChR antibody (1:100; DSHB, Iowa City, IA, USA). Appropriate Alexa Fluor 488/594/647-conjugated secondary antibodies (1:1000; Invitrogen) were used with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) nuclear counterstain (1:1000; Invitrogen) for 2h at room temperature. Staining was visualized and imaged on an Evolve EMCCD camera (Zeiss, Oberkochen, Germany) coupled to a Spinning Disk system (Nipkow,

CSU-X1M 5000; Zeiss) with Metamorph (Molecular Devices, San José, CA, USA). Images were processed with Photoshop 2020 (Adobe, Mountain View, CA, USA) and ImageJ version 1.52 (NIH, Bethesda, MD, USA). To quantify Islet1⁺ hMNs, cells were counted with the aid of the Cell Counter plugin for ImageJ. To quantify myotubes fusion index, the ratio of the nuclei number in MF20⁺ myotubes with ≥ 3 nuclei versus the total number of nuclei was calculated with the aid of an ImageJ plug-in determining the number of nuclei at which another staining of interest is colocalized.

RNA Extraction and Quantitative Reverse Transcriptase Chain Reaction (RT-qPCR)

hMNs were plated onto 24-well plate. Total RNA from two wells was isolated with the PicoPure RNA Isolation Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Human total adult Spinal Cord RNA (BioChain Institute Inc., Newark, CA, USA) was used as positive control. cDNA was generated from 0.5 μ g of RNA with High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). Quantitative real time-polymerase chain reactions (QRT-PCRs) were performed with the TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and the following TaqMan Human Gene Expression Assays: ISLET1 (Hs00158126_m1); ACHE (Hs01085739_g1); CHAT (Hs00252848_m1); SYP (Hs00300531_m1); SNAP25 (Hs00938962_m1); VAMP1 (Hs01042310_m1); VAMP2 (Hs00360269_m1); VAMP3 (Hs00922166_m1); SV2A (Hs01059458_m1); SV2B (Hs00208178_m1); SV2C (Hs00392676_m1); SYT1 (Hs00194572_m1); SYT2 (Hs00980604_m1); and GAPDH (Hs03929097_g1). Quantification was performed at a threshold detection line (Ct value). The Ct of each target gene was normalized to GAPDH housekeeping gene.

Botulinum neurotoxins treatment

Cells were exposed to several doses of recombinant BoNT/A (rBoNT/A) produced from *Escherichia Coli* as previously described [38] or modified BoNT (mBoNT). Both toxins were engineered and purified to more than 90% by IPSEN (Milton Park, UK). Each dose of BoNTs was tested in triplicate and a negative control (toxin-free medium) was always included. For Western blotting experiment, after 24h the medium containing the toxin was removed, cells were washed with PBS and lysed.

SNAP25 cleavage assay by western blot

Cells protein lysis and western blot were performed as previously described [31]. Bands were visualized on an ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, MA, USA) and processed with Image Studio Lite (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). For analysis, the half

maximal effective concentration (EC_{50}) was calculated with GraphPad Prism version 8.3 (GraphPad Software).

Muscle cells contractions and Ca^{2+} transient measurements

Cocultures at DIV 15 were placed in 96-well plate in a live imaging system with an Evolve EMCCD camera coupled to a Spinning Disk system (Zeiss), and timelapse imaging (1 min film with time interval of 300 ms for each recording) was performed under physiological conditions (37°C and 5% CO_2). Recording was done before drugs addition and after addition in a same myofiber of 5 μM tetrodotoxin (TTX; Tocris Bioscience, Bristol, UK), 150 μM tubocurarine (Sigma-Aldrich), rBoNT/A (IPSEN). For Ca^{2+} measurements cells were loaded for 15 min with 2 μM Cal520 (Abcam, Cambridge, UK) a Ca^{2+} indicator in loading buffer then washed 3 times with recording buffer. The loading buffer was composed of a mix between 10X Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) calcium magnesium/distilled water (1:8 ratio; Gibco), 1M hepes (20 mM; Gibco) and sodium hydroxide (2 mM NaOH; Sigma-Aldrich). The recording buffer was composed of a mix between 10X HBSS/distilled water (1:8 ratio; Gibco), 1M hepes (20 mM; Gibco), sodium hydroxide (2 mM NaOH; Sigma-Aldrich) and calcium chloride (2 mM $CaCl_2$; Sigma-Aldrich). For each recording (contractions and Ca^{2+}) we used three myofibers/well and three wells/condition. Myotubes contractions analysis were performed with an open-source software tool MUSCLEMOTION following the instructions from the software [39]. This software quantifies movement by subtracting the summed, absolute changes in pixel intensity between a reference frame and the frame of interest. Ca^{2+} oscillations analysis were performed with the semi-automated open-source Ca^{2+} imaging analyzer CALIMA to detect Ca^{2+} activity in myotubes by following the instructions from the software [40].

Adeno associated virus transduction

The photoactivated domain ReaChR was obtained from Addgene (Watertown, MA, USA) under human Synapsin 1 (hSyn1) promoter (Plasmid #50954) as well as the plasmid containing the calcium sensor GCaMP6f under Human cytomegalovirus (CMV) promoter (Plasmid #40755). Both plasmids were packaged into Adeno associated virus serotype 2 (AAV2) with a functional titer of 10^{13} GC/mL by Vigene Biosciences (Rockville, MD, USA). To define the best MOI for ReaChR and GCaMP6f transduction, muscle cells and hMNs were exposed to viral doses ranging in MOI of control vectors AAV2-CMV-GFP (Applied Biological Materials, Richmond, Canada) for muscle cells and AAV2-hSyn1-GFP (Vigene Biosciences) for hMNs. To quantified GFP⁺ control signal in hMNs and in muscle cells,

colocalization between GFP⁺/Phalloidin⁺ muscle cells and GFP⁺/Islet1⁺ hMNs was counted using the ImageXpress Micro Confocal High-Content Imaging System (Molecular Devices, San José, CA, USA). After selecting the appropriate MOI, muscle cells were transduced at DIV 1 post-seeding with AAV2-CMV-GCaMP6f-WPRE-SV40pA construct with 5000 MOI, and hMNs were transduced with AAV2-hSyn1-ReaChR-citrine construct at DIV 8 post-seeding hMNs over muscle cells with 10 000 MOI.

Optogenetic stimulation procedure and Ca²⁺ measurements

Optogenetic imaging experiments were performed in specific recording buffer where detailed in the section "Muscle cells contractions and Ca²⁺ transient measurements" above. Red light stimulation of cells was triggered with a Fiber-Coupled LED 590 nm (Thorlabs, Newton, NJ, USA) connected to a DC4100 4-Channel LED Driver (Thorlabs) in live imaging system with a Spinning Disk (Zeiss) under physiological conditions. ReaChR⁺ hMNs were activated at 20 mW/cm² intensity with the optical fiber by 20 pulses of light, each pulse having a duration of 20 ms. Recordings were acquired with Metamorph (Molecular Devices). The addition of drugs was performed for optogenetics assay: 150 µM tubocurarine (Sigma-Aldrich), 50 µM glutamate (Sigma-Aldrich), BoNTs (IPSEN). For BoNTs assay, recordings were performed before addition and 4h/8h after exposure. For all recording we used three myofibers/well and three wells/condition. Ca²⁺ oscillations analysis was performed using ImageJ version 1.52 (NIH) with Region of Interest (ROI) manager and using CALIMA software [40]. Fluorescence changes in GCaMP6f⁺ myotubes were expressed as the ratio F590/F0 normalized to basal values ($\Delta F/F_0$). Subsequently, the transmission of emission light intensity was quantified with a thermophile UNO laser power meter (Gentec Electro-Optics, Québec, Canada).

Statistics

Results were expressed as mean \pm SD or SEM depending on assays. All statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 8.3 (GraphPad Software). Mann-Whitney and ANOVA tests were used to determine statistical significance (*,[#]p<0.1; **,^{##}p<0.01; ***,^{###}p<0.001; ****,^{####}p<0.0001; n.s., not significant).

Results

Production of human motor neurons from iPSCs to study BoNT activity

In order to secure large quantity of cells for this study we produced and quality controlled undifferentiated hiPSCs using a Compact Select automate as previously described [41] (Supplementary Fig. 1a,b,c). In the same line, hMNs progenitors were produced (Supplementary Fig. 2a) and terminally differentiated them into post-mitotic motor neurons as previously described [36]. To control the cellular identity of our neuronal population, we assessed the expression of key markers by RT-qPCR and immunofluorescence after 14 days *in vitro* (DIV 14). RT-qPCR analysis revealed expression levels of neuronal (MAP2), hMNs (Islet1), cholinergic (AChE, ChAT) and synaptic (SYP) markers at least 10-fold and up to 100-fold higher than expression in human total adult spinal cord control (Supplementary Fig. 2b). Immunostaining confirmed the expression of Islet1 and Tuj1 markers in hMNs (Supplementary Fig. 2c). This confirmed the robustness of the protocol to obtain highly enriched hMNs with the WTSli020-B hiPSC line. Next, to assess the relevance of such hMNs for BoNTs studies, we measured the expression level of BoNTs SNARE substrates and BoNTs receptors. RT-qPCR data showed that hMNs expression level of BoNTs substrates synaptosomal protein (SNAP25), vesicle-associated membrane protein (VAMP1/2/3), synaptic vesicle (SV2A/B/C) and synaptotagmin (SYT1/2) receptors was at least 5-fold and up to 100-fold higher than our reference spinal cord sample (Supplementary Fig. 2b). Overall, these results suggested that hMNs were suitable for BoNTs studies.

Characterization of the muscle-nerve coculture and evidence of motor endplate formation

We next sought to evaluate the capacity of hMNs to functionally interact with skeletal muscle cells, DIV 10 hMNs progenitors were seeded directly over immortalized human myotubes (AB1167c4 line from the MyoBank, Institute of Myology, Paris) (Supplementary Fig. 3). The differentiation of both hMNs and myotubes was observed after 15 days of coculture and showed that hMNs developed a typical morphology of mature neurons with a tendency to form cell body clusters and with axons terminated on large myotubes (Fig. 1a).

To confirm the identity and maturity of each type of cells in our muscle-nerve *in vitro* model, we immunostained the coculture with antibodies against neuron-specific class III tubulin (Tuj1) and Islet1 a transcription factor expressed in post-mitotic hMNs to identify the neuronal component of the coculture. Myogenic markers such as Myosin Heavy Chain (MF20) and sarcomeric alpha actinin (SAA) were also analyzed to identify multi-nucleated striated myotubes. Islet1⁺ nuclei tended to be

grouped into cluster from which bundles of Tuj1⁺ neurites extended (Fig. 1b). MF20-positive soma containing multiple DAPI-stained nuclei exhibited striated band patterns stained with SAA suggesting the formation of the contractile system for muscle cells (Fig. 1c,d,d'). We next analyzed the presence of neuromuscular synapses using antibodies against markers of the presynaptic component (Neurofilament SMI32, synaptophysin/SYN, and synaptosomal protein SNAP25) and against the acetylcholine receptor (AChR) in the post-synaptic component of the NMJ (Fig. 1e,e',f,g). Multiple clusters of SYN⁺ staining juxtaposed with AChR clusters along myotubes suggesting the formation of motor endplate (Fig 1e,e'). Validating these observations, we detected puncta of synaptosomal protein SNAP25 in hMNs at the close proximity of AChR clusters (Fig. 1g). To assess whether coculture of hMNs with muscle cells had an impact on either cell maturation, we quantified the percentage of Islet1⁺ hMNs in mono-culture and in coculture. We evidenced neither enhanced or decreased percentage of viable Islet1⁺ hMNs in coculture compared to hMNs mono-culture (76.45% and 78.06% on average, respectively, p=0.28) (Fig. 1h, left). Likewise, the fusion index of myogenic cells was found to be similar independently of the presence of hMNs (Fig. 1h, right).

Human muscle-nerve coculture form functional motor endplate

At the functional level, myotube contractions were observed after 15 days of cocultures whereas no contractions were detected in myotubes in mono-culture suggesting that hMNs input was necessary for such stimulation of muscle cells. We next challenged the muscle-nerve system with TTX (5 μ M), a voltage-dependent sodium channels blocker, or tubocurarine (150 μ M), an AChRs antagonist, to assess whether muscle contractions were mediated by action potential-dependent synaptic activity and ACh neurotransmission. Both TTX and tubocurarine blocked myotubes contractions in muscle-nerve coculture (p<0.0001) (Fig. 1i and Supplementary Video 1). Because variation of pixel intensities used to quantify myotubes contractions tended to vary from preparation to preparation and over time and thus make this read-out difficult to exploit, we tested the monitoring of calcium level in myotubes as an alternative to myotubes contractions. The fluorogenic Ca²⁺-sensitive indicator, Cal520, was therefor used to quantify Ca²⁺ transient in skeletal muscle cells in the presence or not of hMNs. Modulation of fluorescence intensity was observed in skeletal muscle cells only in the presence of hMNs (Fig. 1j). A pharmacological approach was used to further confirm the specific and functional connectivity between hMNs and skeletal muscle cells. Then, treatment with TTX and tubocurarine completely abolished Ca²⁺ transient in myotubes in the presence of hMNs (p<0.0001)

(Fig. 1j and Supplementary Video 2). Altogether, our results suggest the presence of a functional motor endplate in these humanized coculture systems.

Effect of BoNTs *in vitro* human motor endplate

We next sought to evaluate the potential of this humanized coculture system in the context of BoNTs. As the mechanism of BoNT action involves the hydrolysis of the proteins of the SNARE complex, such as the hydrolysis of SNAP25, VAMP or syntaxin in function of BoNTs serotypes [13,42], the cleavage activity of rBoNT/A, a recombinant BoNT of serotype A, on SNAP25 was evaluated by western blot analysis after treatment of hMNs alone or cocultured with skeletal muscle cells. This analysis revealed a dose dependent activity of the toxin independently of the cellular system. In addition, similar EC_{50} was found for hMNs alone or cocultured with skeletal muscle cells (0.61 pM and 0.49 pM, respectively) (Fig. 2a,b,c). These biochemical analysis confirmed that the humanized *in vitro* model of human motor endplate was as sensitive to BoNT/A than hMNs alone and that the potency of the toxin on our system was similar to that previously observed with the same BoNT with another sources of hMNs [29,31].

We next assessed the ability of four specific doses of rBoNT/A consistent with the range of toxin doses previously used for the first Western blotting to affect myotubes contractions and Ca^{2+} transient over time using live video microscopy. We observed an interruption in frequency of myotubes contractions after 24 hours of rBoNT/A treatment with the two highest doses of 1 nM and 5 nM (for both doses: $p < 0.0001$) (Fig. 2d). Treatment with lower doses of rBoNT/A (0.001 nM and 0.00001 nM) only decreased partially the myotubes contractions (Fig. 2d). After 16 hours of exposure with rBoNT/A, no decrease of myotubes contractions was observed (Fig. 2d). Two-fold decrease of frequency or complete blockade of Ca^{2+} transient in myotubes was similarly observed but at earlier time post-exposure (4 hours and 7 hours) after rBoNT/A treatment with the lowest dose of 0.001 nM ($p_{4hpe} < 0.01$ and $p_{7hpe} < 0.0001$) and the two highest dose of 5 nM and 1 nM (for both doses: $p_{4hpe} < 0.0001$ and $p_{7hpe} < 0.0001$), respectively (Fig. 2e). Altogether, these results indicated the relevance of recording BoNT activities by using hiPSC-based cellular model of NMJ. In complement to biochemical analysis, this cellular system also offers the possibility to monitor longitudinally functional read-outs such as muscle contractions and Ca^{2+} transient. This later was found to be more reliable and revealed BoNT effect after only 4 hours after exposure while an effect on SNAP25 cleavage was observed only after 24 hours of treatment. Accordingly, we validated that the EC_{50} for

SNAP25 cleavage was similar to the concentration necessary to decrease by half the frequency of muscle contraction or Ca^{2+} transient (Supplementary Fig. 4a,b).

Light activation of ReaChR in hMNs induce Ca^{2+} changes in myotubes

With the aim of allowing longitudinal monitoring of our model of humanized motor endplate while avoiding the toxicity of long term exposure to Ca^{2+} dyes such as Cal520 [43], we used genetically encoded Ca^{2+} indicator GCaMP6f. We transduced human myoblast with the GCaMP6f in order to gain access to an easy way to monitor longitudinally Ca^{2+} transients only in muscle cells (Fig. 3a). To obtain a constitutive expression in myotubes, the expression of Ca^{2+} sensor was placed under the CMV promoter. Using an AAV2-CMV-GFP reporter virus, we first determined that a MOI of 5000 was necessary to achieve optimal skeletal muscle cell transduction (Supplementary Fig. 5a,b,c). In order to gain control over the neuronal activity of our functional motor endplate, we chose the use of ReaChR optogene whose expression was placed under the human synapsin promoter to ensure transgene expression restricted to only neurons (Fig. 3a). Similarly, using an AAV2-hSyn1-GFP reporter virus we determined that a MOI of 10 000 was required to efficiently transduce hMNs (Supplementary Fig. 5a,d,e). We next validated that indeed ReaChR expression was restricted to hMNs whereas expression of GCaMP6f was detected in the cytoplasm of polynuclei skeletal muscle cells (Fig. 3b).

In order to determine the adequate parameters to achieve optimal stimulation, the light power intensity depending on the current applied by the laser at 590 nm was measured. We consequently chose to work with the maximum capacity of the laser corresponding to a light power of 20 mW/cm^2 applied on the cells in our optogenetics platform (Supplementary Fig. 5f,g). We next determined that the optimized stimulation of ReaChR⁺ hMNs was induced by 20 red light pulses of 20 ms each, each light pulse having a power of 20 mW/cm^2 as previously identified (Fig. 3c). Because hMNs are spontaneously active, we observed spontaneous Ca^{2+} oscillations in skeletal muscle cells before light stimulation. Then, light stimulation was found to induce increased Ca^{2+} oscillations frequency with a higher Ca^{2+} oscillation following the pulses of light (Fig. 3d and Supplementary Video 3). The quantification of Ca^{2+} oscillations clearly showed an increase within 60 seconds post-stimulation and a recovery the following 60 seconds (Fig. 3d').

To fully demonstrate the potential of the optogenetic approach to analyze the functional communication between hMNs and human skeletal muscle cells, we tested several drugs known to

inhibit or activate the activity of the muscle-nerve system. As expected tubocurarine prevented light-induced increase of the frequency of Ca^{2+} transients in myotubes (Fig. 3e and Supplementary Video 4), that was confirmed with the quantification of Ca^{2+} oscillations showing the inhibiting effect (Fig. 3e'). In contrast, glutamate stimulation triggered an increase of Ca^{2+} transients in myotubes that remained unchanged after light stimulation (Fig. 3f,f' and Supplementary Video 5). Altogether, the results demonstrated that skeletal muscle cells' activity could be induced by light-activated hMNs. This effect could be abolished or increased with blocker or activator treatment, respectively. Thus, humanized *in vitro* cell model of NMJ combined with optogenetics tool can further be compatible with analysis of functional connectivity between ReaChR⁺ hMNs and GCaMP6f⁺ myotubes.

Impact of BoNTs exposure on optogenetic controlled human motor endplate *in vitro*

The adaptability of the light-sensitive humanized *in vitro* system to decipher the effects of BoNTs was next evaluated. We compared the effect of two different toxins, rBoNT/A and modified BoNT (mBoNT), to assess whether our system could evidence different activities or signs of different mechanism of action. We chose to record the Ca^{2+} activity in GCaMP6f⁺ myotubes in response to optical stimulation of ReaChR⁺ hMNs before and after exposure to toxins for 4 hours and 8 hours, compared to control condition with no treatment (Fig. 4a). We confirmed that the light stimulation at 590 nm increased Ca^{2+} oscillations in skeletal muscle cells (Fig. 4b,b'). In contrast, a progressive reduction of Ca^{2+} oscillations was observed in skeletal muscle cells independently of the doses of rBoNT/A and independently of optical stimulation. A total inhibition was observed after 8 hours post exposure with the highest dose at 5 nM (Fig. 4c-c'). A similar effect was observed with the mBoNT, but in this case the highest dose of 5 nM resulted in a complete disruption of the Ca^{2+} oscillations as soon as 4 hours post-exposure, whereas the lower dose of 0.0016 nM led to a total inhibition 8 hours post-exposure (Fig. 4d-d'). The effect observed with mBoNT showed a higher potency compared to rBoNT/A. This result was concordant with the biochemical analysis of SNAP25 cleavage measured by Western blotting in hMNs after 24 hours of exposure with mBoNT in which an EC_{50} of 0.01 pM as calculated (Supplementary Fig. 6a,b).

Altogether, these data confirmed that the capacity of light-sensitive humanized *in vitro* NMJ model to determine the effect of BoNTs as soon as 4 hours after treatment, but also for comparative analysis of different BoNTs. This comparison between BoNTs highlighted the possibility to study difference in onset of action and duration of action, which could represent a considerable advantage over the

routine western blot test for BoNTs potency measurement. Indeed, light-sensitive humanized *in vitro* NMJ could represent a faster and more physiological system for the field of BoNTs.

Discussion

The main finding of this study is the description of a novel *in vitro* human functional motor endplate model which is based on the differentiation of hiPSC-derived motor neurons and immortalized human skeletal muscle cells. In this system, hMNs established functional synaptic contact with human myotubes that are sensitive to pharmacological challenge of hMNs synaptic activity and ACh neurotransmission. To gain a better control and ease to monitor neuromuscular activity, we genetically engineered our motor endplate model with neuronal optogene (ReaChR) and muscular-calcium sensor (GCaMP6f).

The increased incidence and prevalence of inherited neuromuscular diseases have led to the development of pertinent pathological models for deciphering the pathophysiology underlying these diseases and developing effective treatments [44]. Although animal models have been crucial in this field, certain limitations still exist in the form of ethical issues involving animal welfare or the capacity of animal models to fully reproduce some human pathological phenotypes. To overcome these hurdles, different models and approaches have been developed to recreate *in vitro* the NMJs. More specifically, the recent advances in human pluripotent stem cell biology have fueled the prospect of generating the main components of the NMJ and consequently humanized NMJ *in vitro* [45]. In the last five years, different studies have already described the possibility of using human pluripotent stem cells to generate optogenetic human motor endplate models for disease modeling applications[46–49]. Concordant with these different reports, our results also validate the potential of human pluripotent stem cells combined with optogenetic technology to recreate a functional humanized NMJ system. Whereas most of these studies described 3D culture models, our study however strengthens the potential of using 2D system. In addition, identifying muscle fibers has been shown to be challenging [24]. In this study we validate the possibility of combining fluorescently labeled skeletal muscle cells (e.g. GCaMP6f⁺) with light sensitive hMNs to improve the detection of innervated skeletal muscle cells in cocultures and avoid toxicity that may be associated to the use of synthetic calcium dye [34,43,46,47,50,51].

Most of the attempts to develop humanized *in vitro* motor endplates have focused so far on their potential use for disease modeling. Thus, different studies have already demonstrated the potential use of these *in vitro* models for Myasthenia Gravis, Amyotrophic Lateral Sclerosis or Spinal Muscular Atrophy [47–49,52]. Our results also extend the potential of humanized *in vitro* models of motor endplate for pharmacological applications such as the field of BoNTs. As a first step, we validated that human induced pluripotent stem cells-derived motor neurons express all the different actors known to be involved in BoNTs intoxication process (i.e. SNARE proteins and BoNT protein receptors). Then, by evaluating one the most widely BoNT serotype (BoNT/A) used for BoNT studies, our results indicate that humanized *in vitro* motor endplate harbor a level of sensitivity to recombinant BoNT/A (rBoNT/A engineered by IPSEN) similar that what is observed with hMNs alone, also with commercial hMNs used for another study by our team [31]. Our results also suggest that hMNs used in this study harbor a higher sensitivity compared to others hMNs models recently described [29,30]. These differences might arise from the origin of BoNT used, protocols for treatment, hMNs differentiation and culture, or in read-out sensitivity [29,30]. Strikingly, our results did not reveal differences in term of sensitivity to toxins between hMNs alone or cocultured with skeletal muscle cells. We could indeed expect that muscle-nerve coculture might enhance the maturation of hMNs and might change or increase their sensitivity to BoNTs. Addition of Schwann cells, another important cellular component of NMJ, could help to better mimic the native structure of synapses and increase the maturity of the system [53–55]. To further validate that the presynaptic activation of hMNs caused changes in muscle activity, we evaluated the functional effect of rBoNT/A in the coculture. The data revealed that rBoNT/A reduced the activity of the muscle until stopped and confirmed the use of calcium transient read-out as a relevant measurement for the activity of BoNTs only few hours after treatment.

Optogenetics technology represents an opportunity for drug screening and disease modeling in the field of BoNT studies. The use of this technology could be applied to study the onset and duration of action of different BoNTs, and to model different neuromuscular disorders such as dyskinesia and spasticity, with distinct activity profile NMJs. In this context, we successful developed a novel metric for monitoring the effect of two BoNTs on *in vitro* functional human motor endplate. This is the first time that two toxins are compared on a controlled *in vitro* human motor endplate model. Our investigations revealed that both toxins, rBoNT/A and mBoNT (engineered by IPSEN), thus acted efficiently on hMNs in a dose-dependent manner. Interestingly, we noted a difference in

the sensitivity of the coculture system to both toxins. The inhibition of neurotransmission was faster after mBoNT exposure than rBoNT/A exposure. This could be explained by the different nature and mechanism of action of the two toxins. These results open new perspectives for comparative analysis of different BoNT serotypes which could have different effects on the muscle calcium read-out. An additional interesting possibility would be to test another serotype of BoNTs that cleaves a different protein than SNAP25, such as BoNT/B that cleaves VAMP protein, to compare the effect of different mechanisms of action.

Finally, the system described in our study could be optimized to be adapted for high-throughput screenings. One possibility will be to use optogenetics reporter lines generated by stable transfection or genome editing as recently described [34]. This could reduce the variability related to several viral infections. Then, to support the fact that hMNs are well activated by light stimulation, we could use a genetic reporter of neuronal activity such as c-Fos to measure the hMNs activity [56,57]. C-Fos is a proto-oncogene expressed within neurons following depolarization and can be identified by immunostaining. Its expression might be used as a marker for neuronal activity following stimulation [58]. Electrophysiology technique could also be used to reinforce the hMNs activation during light stimulation. Another interesting approach that can be used is to combine multi-electrode array recording and optogenetics and measure the electrical activity of the coculture system, that could be a new functional read-out to explore in a high-content context [34,59,60].

Conclusions

Developing human functional *in vitro* model system has attracted interests of multiple scientific domains, from studying human physiology, investigating disease etiology and developing therapeutic design, to generating high throughput systems for drug screening [61]. In the context of BoNT studies, the generation of a muscle-nerve system based on hiPSC-derived technology sensitive to toxins provides the demonstration that an *in vitro* model of human functional motor endplate can provide major benefits in the production of preclinical data with high translational value for futures BoNT therapeutics.

Figure captions

Fig. 1 Generation of an *in vitro* functional muscle-nerve coculture system at DIV 15.

a Representative images of the muscle-nerve coculture where hMNs neurites made contacts with myotubes (black triangle in the phase contrast image). **b** hMNs express Islet and Tuj1. **c-d/d'** Myotubes express MF20 and SAA. **e/e'-g** The coculture system express SYN (right and lower panels represent cross-sections of myotubes in the orthogonal view), SMI32, SNAP25, and presents AChR clusters. **a-g** Scale bars: 100 μm . **h** Quantification of Islet1⁺ hMNs and quantification of fusion index in myotubes. Data are represented as mean \pm SD (N=3 independent experiments, each performed in triplicate n=3). Mann-Whitney test (n.s., not significant). **i** Disruption of myotubes contractions after treatment with 5 μM TTX and 150 μM tubocurarine compared to control condition with no treatment. Each drug was added at DIV 15, the recording of myotubes contractions was performed before treatment (baseline) and 30 min after treatment. **j** Disruption of Ca²⁺ oscillations in myotubes after treatment with 5 μM TTX and 150 μM tubocurarine compared to control condition with no treatment. For Ca²⁺ measurement cells were stained with 2 μM Cal520 dye the day of the recording. Each drug was added at DIV 15, the recording of Ca²⁺ oscillations was performed before treatment (baseline) and 30 min after treatment. **i-j** Data are represented as mean \pm SEM (N=3 independent experiments, each performed in triplicate n=3). ANOVA with Dunnett's post-hoc tests (****p<0.0001).

Fig. 2 Effect of botulinum neurotoxin on muscle-nerve coculture function.

a Detection by western blot of cleaved-SNAP25 from hMNs mono-culture (left) or coculture (right) treated with serial doses of rBoNT/A, compared to toxin-free control dose (untreated) using an antibody recognizing cleaved and uncleaved form of SNAP25 protein. **b** EC₅₀ curve for hMNs in mono-culture or in coculture. DIV 15 hMNs were exposed to rBoNT/A for 24 hours before cell lysates were harvested, followed by western blot to quantify SNAP25 cleavage. **c** EC₅₀ for hMNs in coculture is 0.49 pM (10^{-12.31}) and EC₅₀ for hMNs in mono-culture is 0.61 pM (10^{-12.21}). Data are represented as mean \pm SEM (N=3 independent experiments, each performed in triplicate n=3). **d** Effect of rBoNT/A on myotubes contractions 16 hpe (hour post-exposure) and 24 hpe. Coculture was treated at DIV 15 with different doses of rBoNT/A (5 nM, 1 nM, 0.001 nM, 0.00001 nM) and recordings of myotubes contractions were performed before treatment (baseline), 16 hours and 24 hours after treatment. Data are represented as mean \pm SEM (N=3 independent experiments, each performed in triplicate n=3). ANOVA with Dunnett's post-hoc tests (***p<0.001; ****p<0.0001). Significant statistics only 24 hpe, each dose was compared to untreated condition. **e** Effect of rBoNT/A on myotubes Ca²⁺ oscillations 4 hpe and 7 hpe. Cells were stained with 2 μM Cal520 dye the day of the recording. Coculture was treated at DIV 15 with different doses of rBoNT/A (5 nM, 1 nM, 0.001 nM, 0.00001 nM) and recordings of Ca²⁺ oscillations were performed before treatment (baseline), 4 hours and 7 hours after treatment. **d-e** Data are represented as mean \pm SEM (N=3 independent experiments, each performed in triplicate n=3). ANOVA with Dunnett's post-hoc

tests ($^{##}p < 0.01$; $^{####,****}p < 0.0001$). Significant statistics 4 hpe (represented by $^{\#}$) and 7 hpe (represented by *), each dose was compared to untreated condition.

Fig. 3 Effect of the optogenetic stimulation of hMNs on the myotubes Ca^{2+} dynamic.

a ReaChR was transduced into hMNs progenitors to enable ion channel activation by light allowing for control of neuronal activity by red light stimulation (590 nm). Optogenetic activation was confirmed by reading the Ca^{2+} response generated in myoblasts transduced with GCaMP6f by quantifying fluorescent intensity. **b** AAV2-hSyn-ReaChR-citrine expression in hMNs for optogenetic control and AAV2-CMV-GCaMP6f-WPRE-SV40pA expression in myotubes. Scale bars: 50 μ m. **c** Representative schema of the optical stimulation protocol at 590 nm: 20 red light pulses, each pulse was 20 ms long. Optogenetics activation was confirmed by GCaMP6f in myotubes by quantifying fluorescent intensity. Scale bars: 50 μ m. **d-d'** Representative traces of normalized GCaMP6f fluorescence before and after red light stimulation (red bar) and quantification of Ca^{2+} oscillations. Data are represented as mean \pm SEM (N=3 independent experiments, 3 myofibers/well, 3 wells/condition). **e-e'** Effect of the addition of 150 μ M tubocurarine before and after red light stimulation (red bar) and quantification of Ca^{2+} oscillations. Data are represented as mean \pm SEM (N=2 independent experiments, 3 myofibers/well, 3 wells/condition). **f-f'** Effect of the addition of 50 μ M glutamate before and after red light stimulation (red bar) and quantification of Ca^{2+} oscillations. Data are represented as mean \pm SEM (N=2 independent experiments, 3 myofibers/well, 3 wells/condition).

Fig. 4 BoNTs effects on optogenetic controlled muscle-nerve system.

a Representative schema of the optogenetic procedure before (baseline/before treatment) and 4 hours and 8 hours after exposure of BoNTs (H+4 and H+8). The addition of both BoNTs was notified by H=0. Cells were exposed to two doses (5 nM or 0.0016 nM) of rBoNT/A or mBoNT. **b-b'** Representative traces of normalized GCaMP6f fluorescence in untreated condition before and after red light stimulation (red bar) over the time and quantification of Ca^{2+} oscillations. Data are represented as mean \pm SEM (N=1 experiment, 3 myofibers/well, 3 wells/condition). **c-c'** Representative traces of normalized GCaMP6f fluorescence at 5 nM rBoNT/A treatment and 0.0016 nM rBoNT/A treatment before and after red light stimulation (red bar) over the time and quantification of Ca^{2+} oscillations. Data are represented as mean \pm SEM (N=1 experiment, 3 myofibers/well, 3 wells/condition). **d-d'** Representative traces of normalized GCaMP6f fluorescence at 5 nM rBoNT/A treatment and 0.0016 nM mBoNT treatment before and after red light stimulation (red bar) over the time and quantification of Ca^{2+} oscillations. Data are represented as mean \pm SEM (N=1 experiment, 3 myofibers/well, 3 wells/condition).

Supplementary information

Supplementary Figure 1. hiPSCs WTSLi020-B characterization and quality control.

a Schematic representation of the culture and the amplification (manual and automated) of hiPSCs WTSLi020-B. **b** Immunofluorescence analysis of common pluripotency markers (NANOG, OCT4, SOX2 and TRA1-60) in hiPSCs. Stainings were performed at P27+4. Scale bars: 50 μ m. **c** Flow cytometry analysis of hiPSCs for TRA1-81 and SSEA4 pluripotency markers. Flow cytometry was performed at P27+8. **d** Detection of genomic abnormalities in hiPSCs. Samples collections were performed at P27+4.

Supplementary Figure 2. hMNs progenitors differentiation.

a Schematic representation of the differentiation protocol based on Maury et al. (2015) to generate hMNs progenitors DIV 10. **b** Gene expression analysis in hMNs DIV 14 of relevant neuronal marker (MAP2), phenotypic markers (Islet1, AChE, ChAT), synaptic marker (SYP), and BoNT substrates (SNAP25, VAMP1, VAMP2, VAMP3) and receptors (SV2A, SV2B, SV2C, SYT1, SYT2). Expression is normalized to GAPDH and to control cDNA (human total adult spinal cord). **c** Immunofluorescence analysis of neuronal markers Islet1 and Tuj1 in hMNs DIV 14. Scale bars: 100 μ m.

Supplementary Figure 3. Muscle-nerve coculture protocol.

Immortalized human myoblasts were seeded in specific myogenic induction medium to induce their proliferation. Day1-post plating myoblasts, hMNs progenitors DIV 10 previously obtained with the protocol developed by Maury et al. (2015) were seeded directly into myoblasts culture. The initial medium was switched with coculture medium to lead to the myotubes fusion, the hMNs differentiation, and the coculture maturation and survival until DIV 15.

Supplementary Figure 4. hMNs sensitivity to rBoNT/A in a single dose.

a Representative western blot showing the cleavage of SNAP25 protein from hMNs in coculture with myotubes treated with four doses of rBoNT/A (5 nM, 1 nM, 0.001 nM, 0.00001 nM) compared to toxin-free control dose (untreated). **b** Quantification of the SNAP25 cleavage for each dose. DIV 15 hMNs in coculture were exposed to rBoNT/A for 24 hours before cell lysates were harvested, followed by western blot to quantify SNAP25 cleavage. Data are represented as mean \pm SEM (n=3 independent experiment each performed in triplicate).

Supplementary Figure 5. Setup for optogenetic stimulation.

a Myoblasts were transduced at DIV 1 with AAV2-CMV-GCaMP6f and hMNs were transduced at DIV 8 with AAV2-hSyn-ReaChR. The muscle-nerve coculture grew for two weeks and then to perform optogenetics assay. **b** (left) Quantification of the dose-dependent increase in AAV2-GFP expression in muscle cells. Data are represented as mean \pm SD (N=2 independent experiment, each performed in triplicate n=3). (right)

Immunofluorescence analysis of GFP⁺/Phalloidin⁺ muscle cells after AAV transduction at the selected MOI 5000 (represented by * in the graph). **c** Phase contrast images of muscle cells before transduction and day1-post AAV2-CMV-GCaMP6f transduction (MOI 5000). Scale bars: 100 μ m. **d** (left) Quantification of the dose-dependent increase in AAV2-GFP expression in hMNs. Data are represented as mean \pm SD (N=2 independent experiment, each performed in triplicate n=3). (right) Immunofluorescence analysis of GFP⁺/Islet1⁺ hMNs after AAV transduction at the selected MOI 10 000 (represented by * in the graph). **e** Phase contrast images of hMNs before transduction and day2-post AAV2-hSyn1-ReaChR transduction (MOI 10 000). Scale bars: 100 μ m. **f** Relation between light power density and current density. **g** Setup for optical stimulation with a spinning disk microscope where the optical fiber is connected to a 590 nm laser connected to a channel controller.

Supplementary Figure 6. hMNs sensitivity to mBoNT.

a EC₅₀ curve for hMNs treated with serial doses of mBoNT for 24 hours, compared to toxin-free control dose (untreated) using an antibody recognizing cleaved and uncleaved form of SNAP25 protein. DIV 15 hMNs were exposed to mBoNT for 24 hours before cell lysates were harvested, followed by western blot to quantify SNAP25 cleavage. Data are represented as mean \pm SEM (N=1 experiment performed in duplicate n=2). **b** EC₅₀ for hMNs is 0.01 pM ($10^{-14.14}$).

Supplementary Video 1. Recording of myotubes contractions in cocultured myotubes before and after tubocurarine treatment. Myotubes contractions were disrupted after the addition of tubocurarine.

Supplementary Video 2. Recording of Ca²⁺ transient in cocultured myotubes before and after tubocurarine treatment. Ca²⁺ oscillations were disrupted after the addition of tubocurarine.

Supplementary Video 3. Recording of GCaMP6f⁺ myotubes signal before and after optogenetics stimulation with red light.

Supplementary Video 4. Effect of the addition of tubocurarine on the recording of GCaMP6f⁺ myotubes signal before and after optogenetics stimulation with red light.

Supplementary Video 5. Effect of the addition of glutamate on the recording of GCaMP6f⁺ myotubes signal before and after optogenetics stimulation with red light.

Abbreviations

AAV2: Adeno Associated Virus serotype 2; AChE: Acetylcholinesterase; BDNF: Brain-derived Growth Factor; BoNTs: Botulinum Neurotoxins; BSA: Bovine Serum Albumin; Ca²⁺: Calcium; ChAT: Choline Acetyltransferase; CMV: human Cytomegalovirus; DAPI: 4',6-diamidino-2-phénylindole; DAPT: γ -secretase inhibitor; DIV: Day in vitro; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium; DXT:

Dexamethasone; EBs: Embryoid Bodies; EC₅₀: Half maximal effective concentration; EGF: Epidermal Growth Factor; EMA: European Medicines Agency; FBS: Fetal Bovine Serum; FDA: Food and Drugs Administration; FGF: Fibroblast Growth Factor; GDNF: Glial-Derived Neurotrophic Factor; HBSS: Hanks' Balanced Salt Solution; HC: Heavy Chain; hiPSCs: human induced Pluripotent Stem Cells; hMNs: hiPSC-derived motor neurons; hpe: Hour post-exposure; hPSCs: human Pluripotent Stem Cells; hSyn: human Synapsin 1; LC: Light Chain; mBoNT: modified Botulinum Neurotoxin; MF20: Myosin 4; MOI: Multiplicity Of Infection; PBS: Phosphate Buffered Saline; PenStrep: Penicillin/Streptomycin; RA: Retinoic Acid; rBoNT: recombinant Botulinum Neurotoxin; ROI: Region Of Interest; SAA: Sarcomeric Alpha Actinin; SAG: Smoothed Agonist; SMI32: Neurofilament H Non-Phosphorylated; SNAP25: Synaptosomal-Associated Protein 25KDa; SNARE: Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor; SV2: Synaptic Vesicle Protein 2; SYT: Synaptotagmin; TTX: Tetrodotoxin; VAMP: Vesicle-Associated Membrane Protein; VTN-N: Vitronectin; β -ME: β -mercaptoethanol.

Acknowledgments

The authors thank Olivier Goureau and Deniz Dalkara (The Vision Institute, 17 rue Moreau, 75012 Paris, France) for their advice on optogenetics tool. Christian Cognard, Stéphane Sebillé and Charles-Albert Chapotte-Baldacci (STIM, 1 rue Georges Bonnet, 86073 Poitiers Cedex 9, France) for their help in the development of optogenetics. Douglas Kim and GENIE Project for gift pGP-CMV-GCaMP6f (Addgene plasmid # 40755 ; <http://n2t.net/addgene:40755> ; RRID:Addgene_40755), and Roger Tsien for gift AAV-ReaChR-citrine (Addgene plasmid # 50954 ; <http://n2t.net/addgene:50954> ; RRID:Addgene_50954). Fanny Noirmain (IPSEN Innovation, 5 avenue du Canada, 91940 Les Ulis, France) for her contribution to the study. Danielle Champagne and Simon Page (IPSEN Bioinnovation, 102 Milton Park, Abingdon OX144RY, United Kingdom) for their contribution and assistance in manuscript reviewing.

Authors' contributions

CN, CM, AP conceived the study. JDL performed all experiments, collection of data, data analysis and interpretation. JP participated on optogenetics development. LL and PF performed hiPSCs amplification, quality control and hMNs differentiation. JDL performed all figures. JDL, CN, CM and AP wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Figure 1

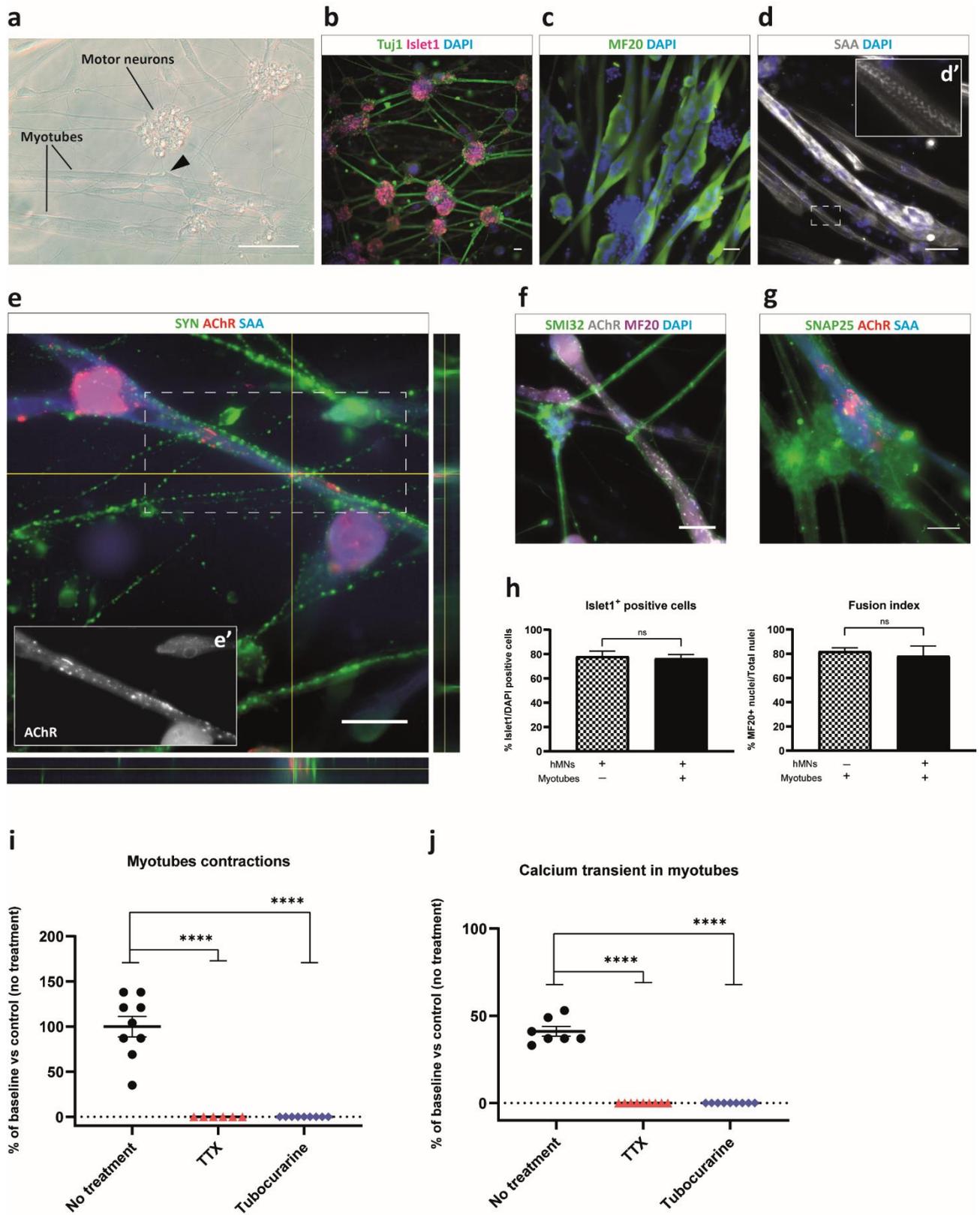


Figure 2

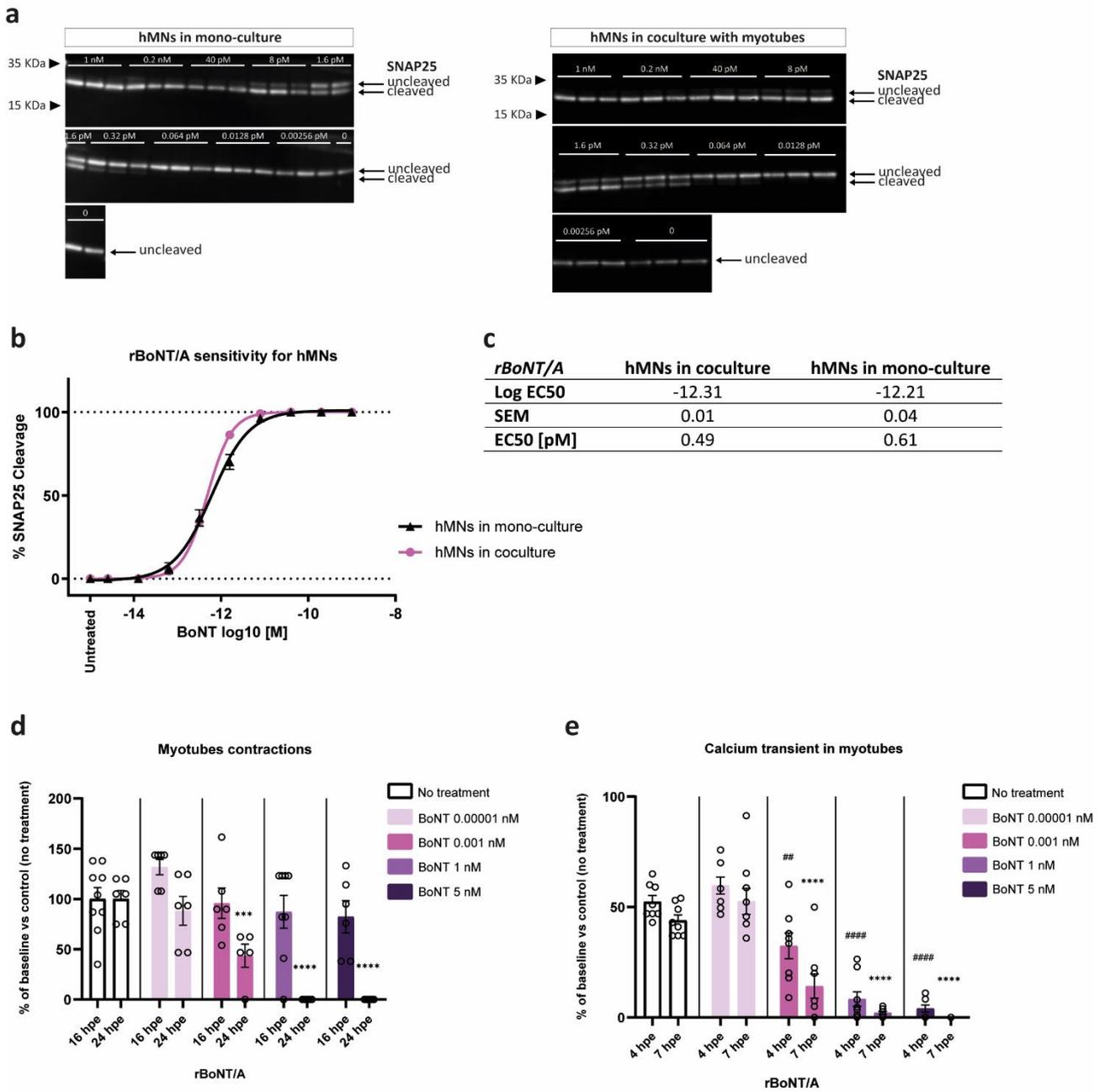


Figure 3

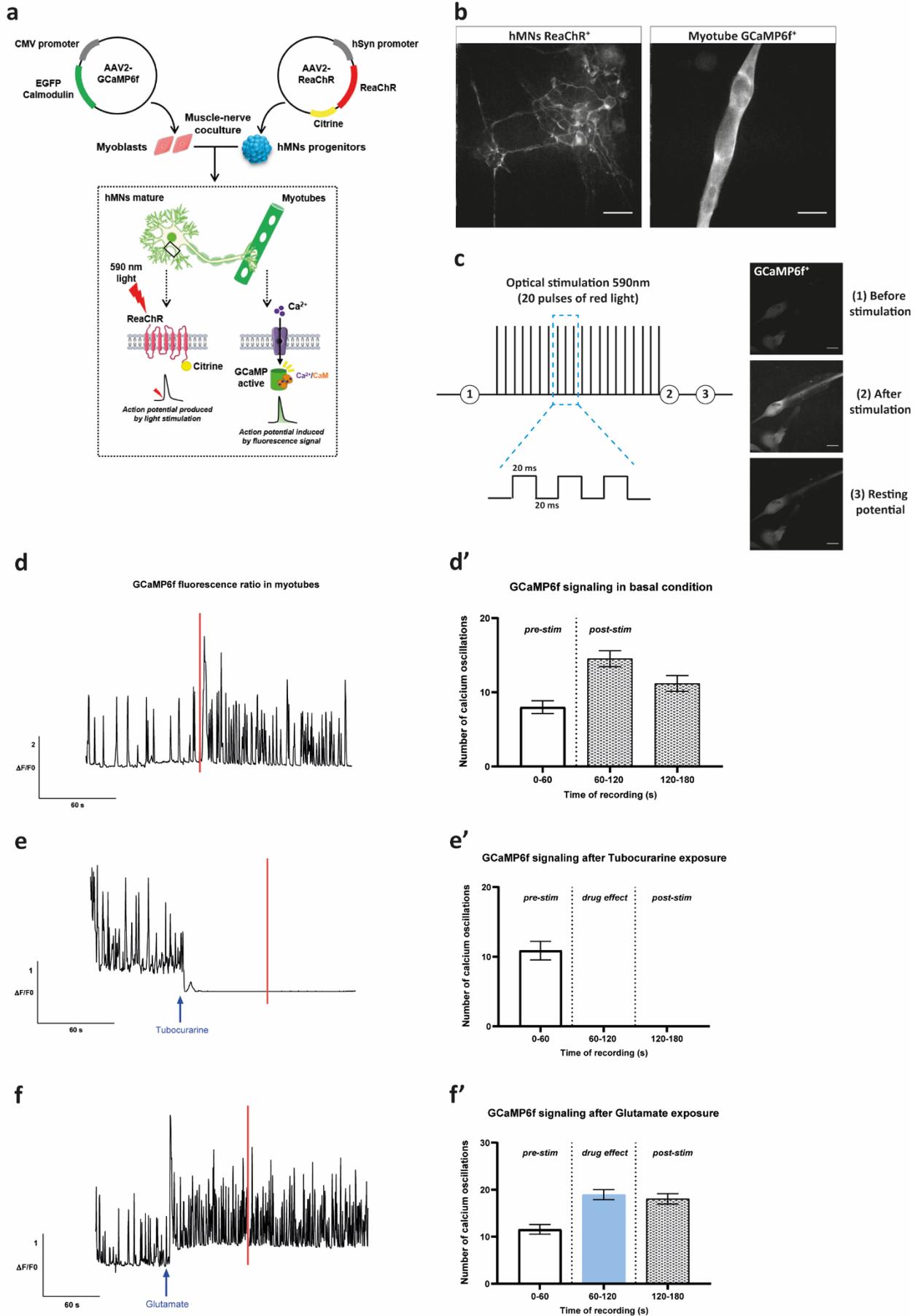
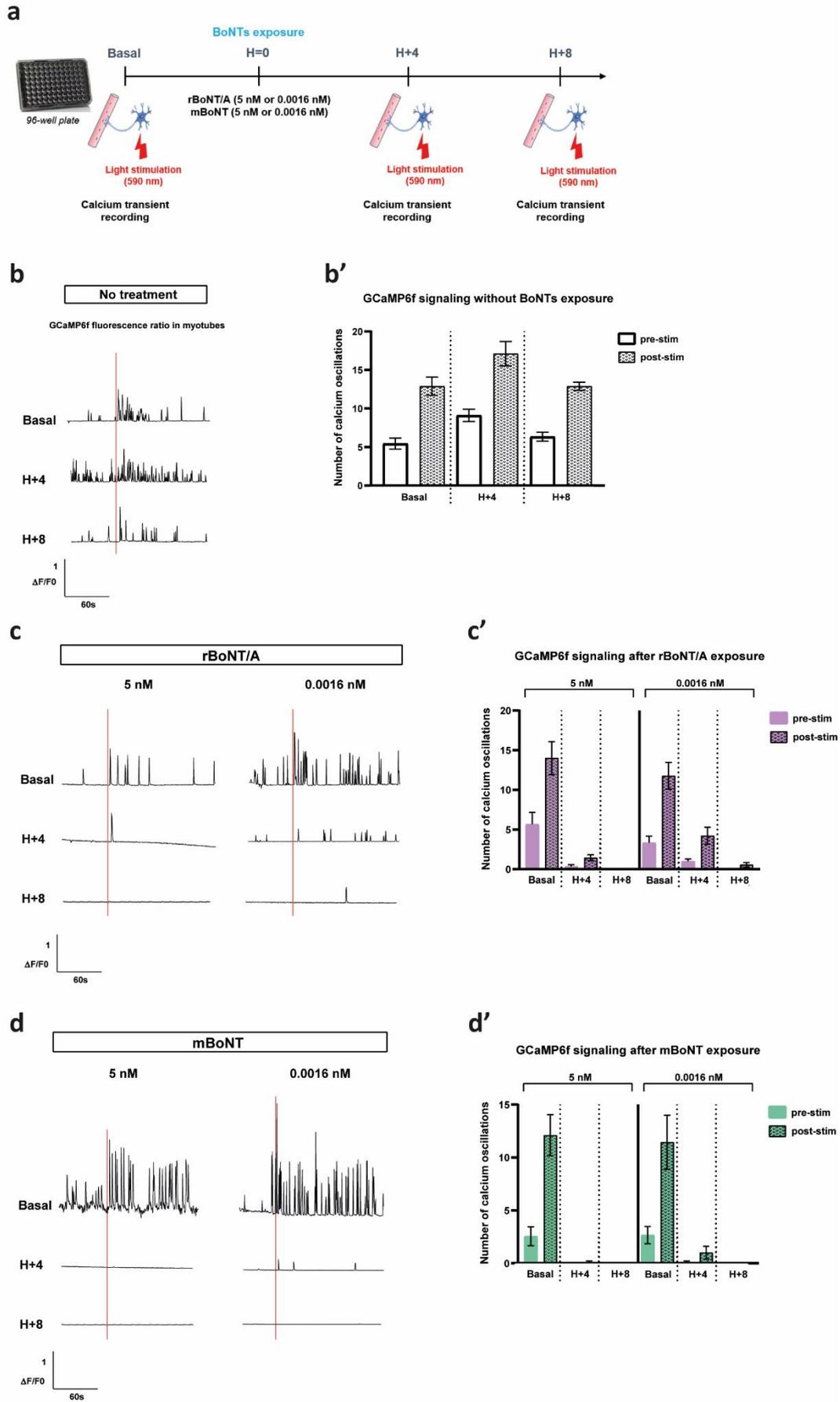
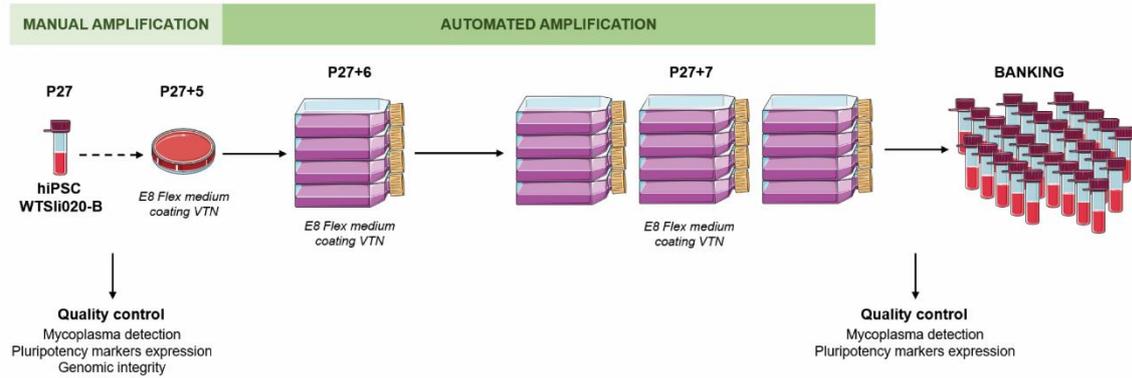


Figure 4

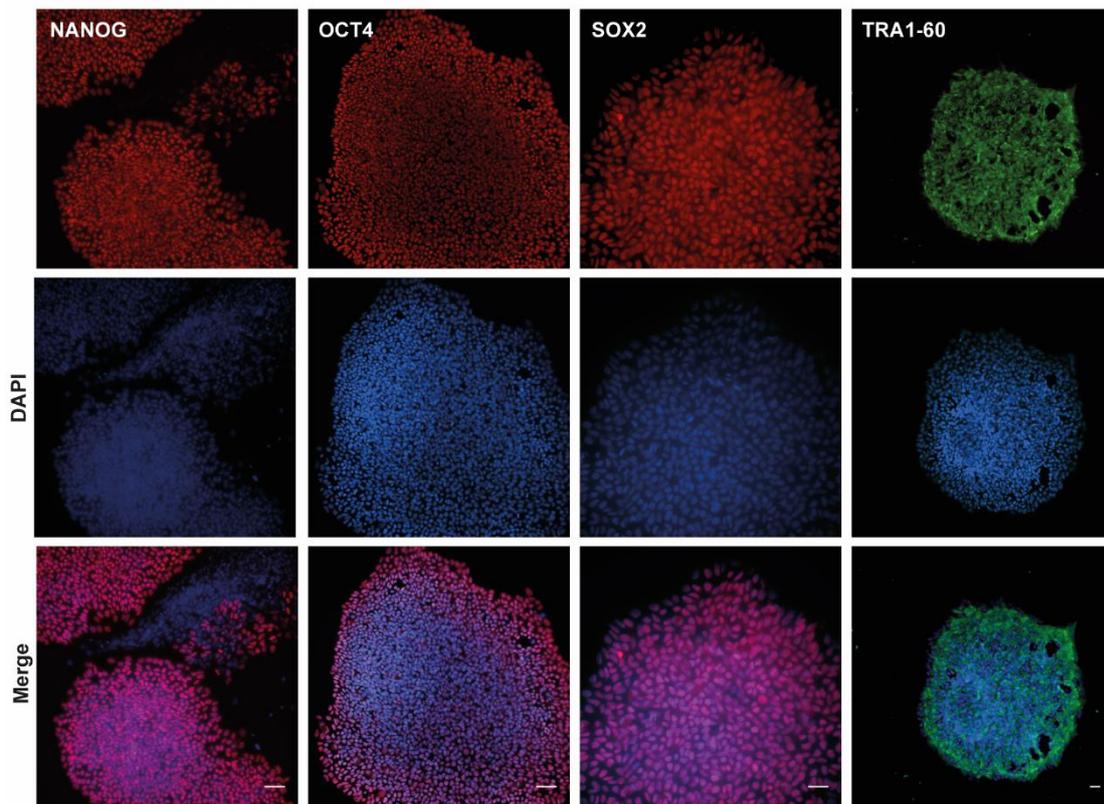


Supplementary Figure 1

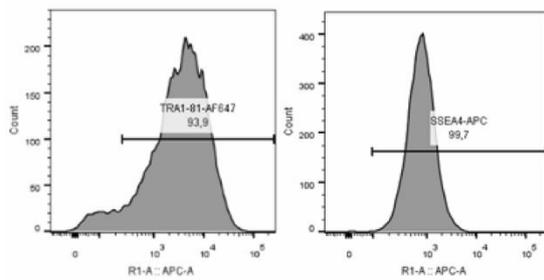
a



b



c

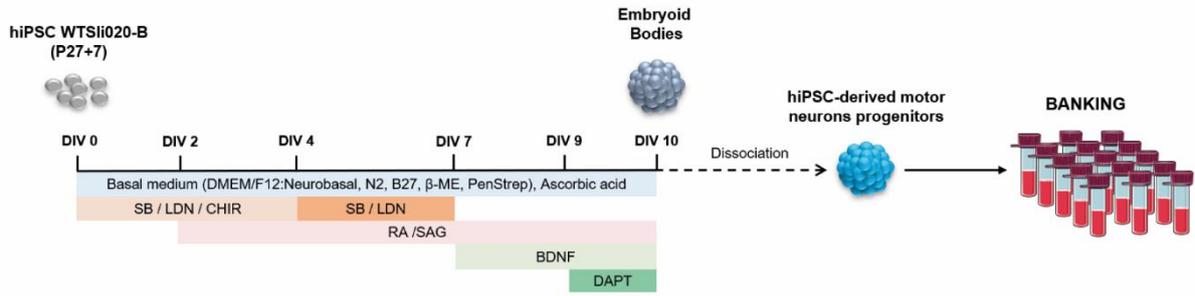


d

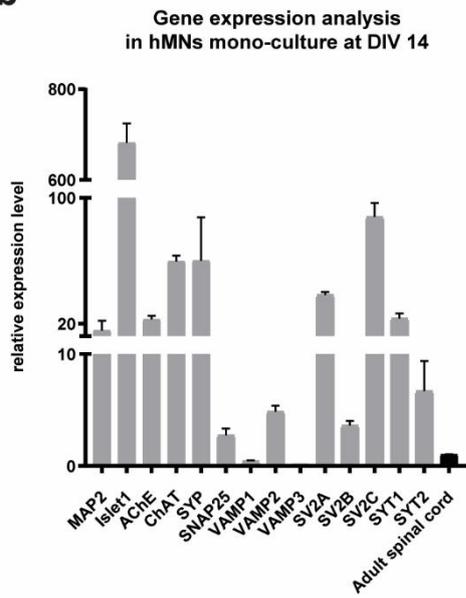


Supplementary Figure 2

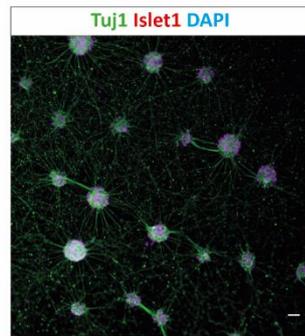
a



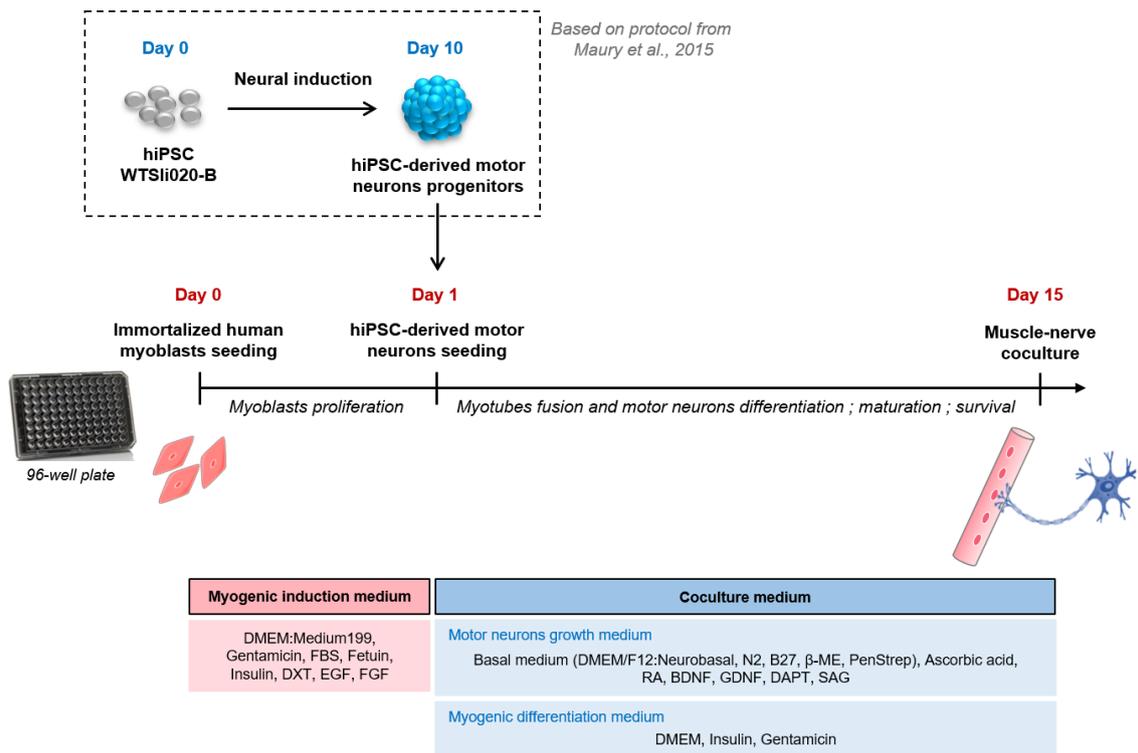
b



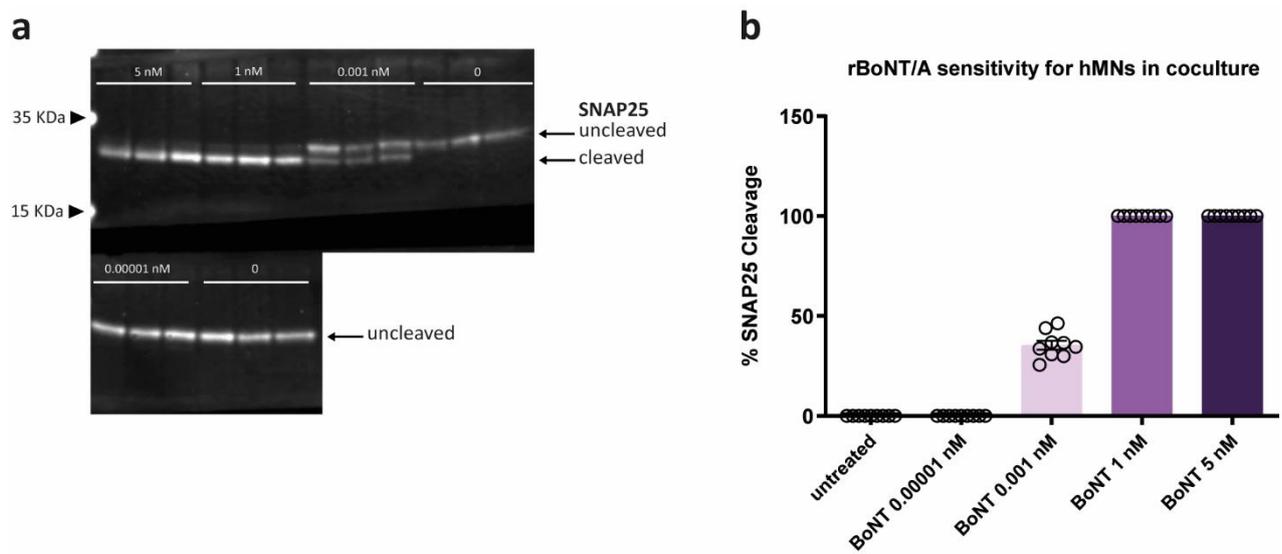
c



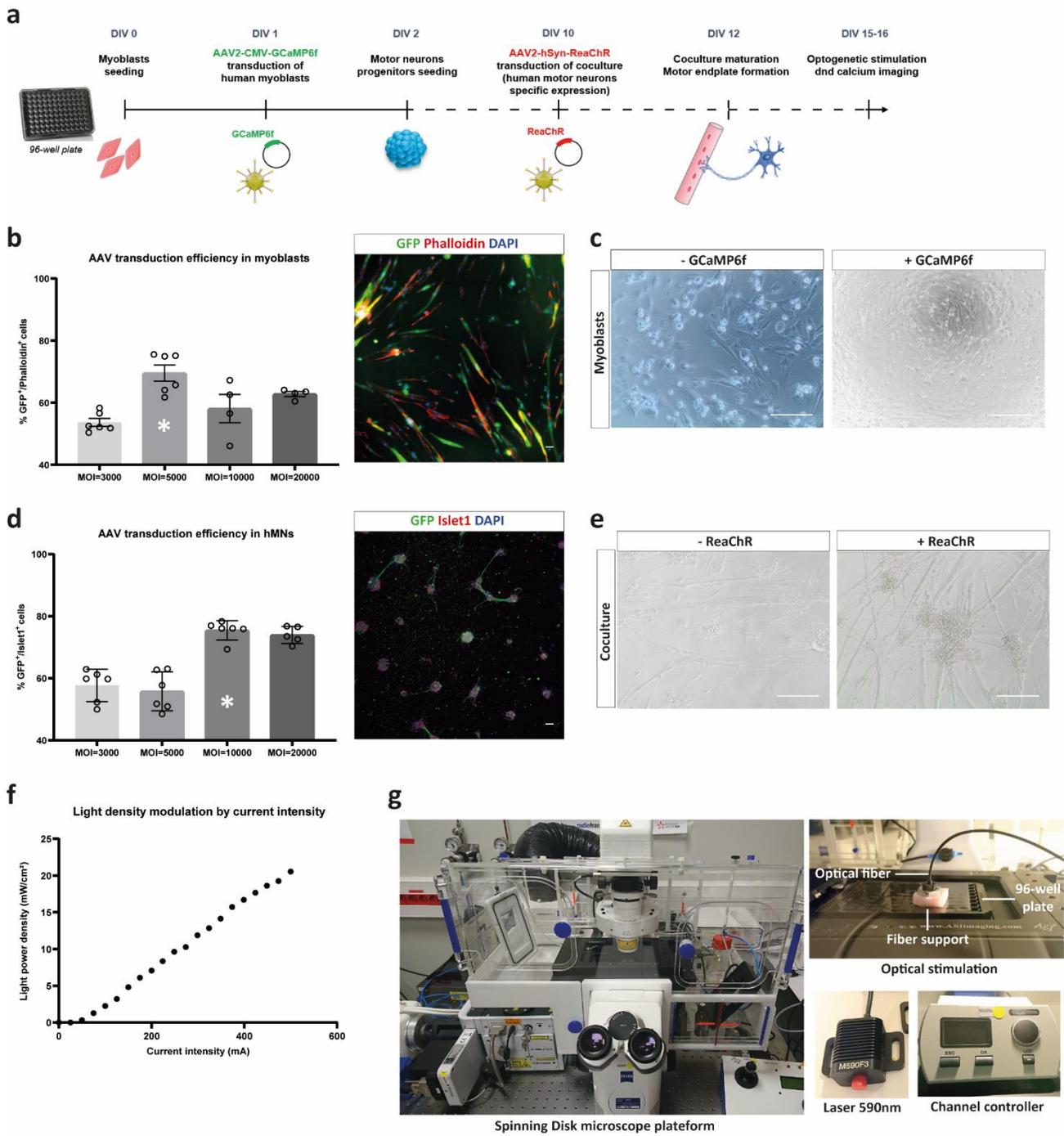
Supplementary Figure 3



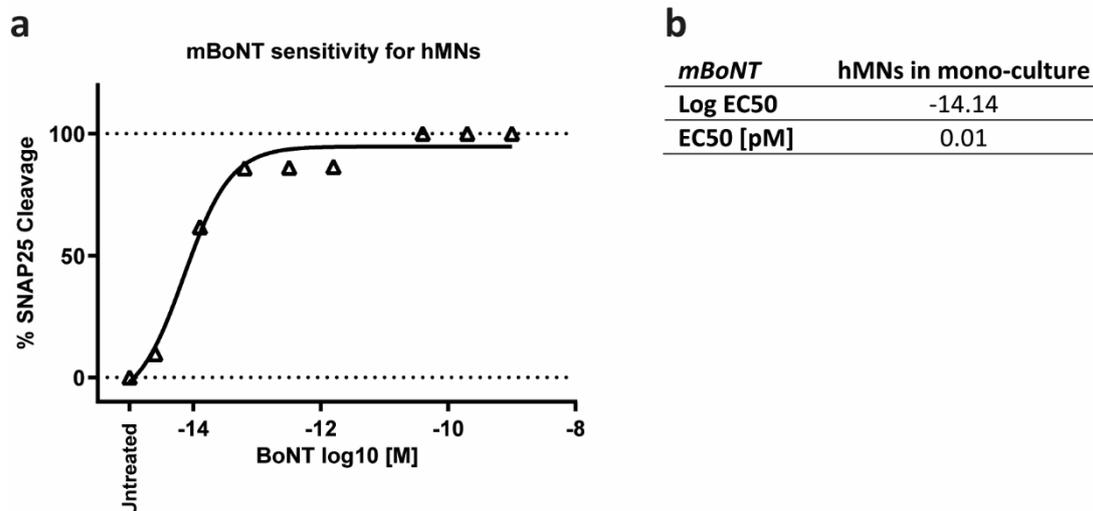
Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 6



References

1. Schiavo, G.; Matteoli, M.; Montecucco, C. Neurotoxins Affecting Neuroexocytosis. *Physiol. Rev.* **2000**, *80*, 717–766, doi:10.1152/physrev.2000.80.2.717.
2. Popoff, M.R.; Poulain, B. Bacterial Toxins and the Nervous System: Neurotoxins and Multipotential Toxins Interacting with Neuronal Cells. *Toxins* **2010**, *2*, 683–737, doi:10.3390/toxins2040683.
3. Pirazzini, M.; Rossetto, O.; Eleopra, R.; Montecucco, C. Botulinum Neurotoxins: Biology, Pharmacology, and Toxicology. *Pharmacol. Rev.* **2017**, *69*, 200–235, doi:10.1124/pr.116.012658.
4. Rossetto, O. Botulinum Toxins: Molecular Structures and Synaptic Physiology. In *Botulinum Toxin Treatment in Clinical Medicine*; Jabbari, B., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2018; pp. 1–12 ISBN 978-3-319-56037-3.
5. Orsini, M.; Leite, M.A.A.; Chung, T.M.; Bocca, W.; De Souza, J.A.; De Souza, O.G.; Moreira, R.P.; Bastos, V.H.; Teixeira, S.; Oliveira, A.B.; et al. Botulinum Neurotoxin Type A in Neurology: Update. *Neurol. Int.* **2015**, *7*, doi:10.4081/ni.2015.5886.
6. Dong, M.; Tepp, W.H.; Liu, H.; Johnson, E.A.; Chapman, E.R. Mechanism of Botulinum Neurotoxin B and G Entry into Hippocampal Neurons. *J. Cell Biol.* **2007**, *179*, 1511–1522, doi:10.1083/jcb.200707184.
7. Giménez, D.F.; Giménez, J.A. The Typing of Botulinum Neurotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* **1995**, *27*, 1–9.
8. Peck, M.; Smith, T.; Anniballi, F.; Austin, J.; Bano, L.; Bradshaw, M.; Cuervo, P.; Cheng, L.; Derman, Y.; Dorner, B.; et al. Historical Perspectives and Guidelines for Botulinum Neurotoxin Subtype Nomenclature. *Toxins* **2017**, *9*, 38, doi:10.3390/toxins9010038.

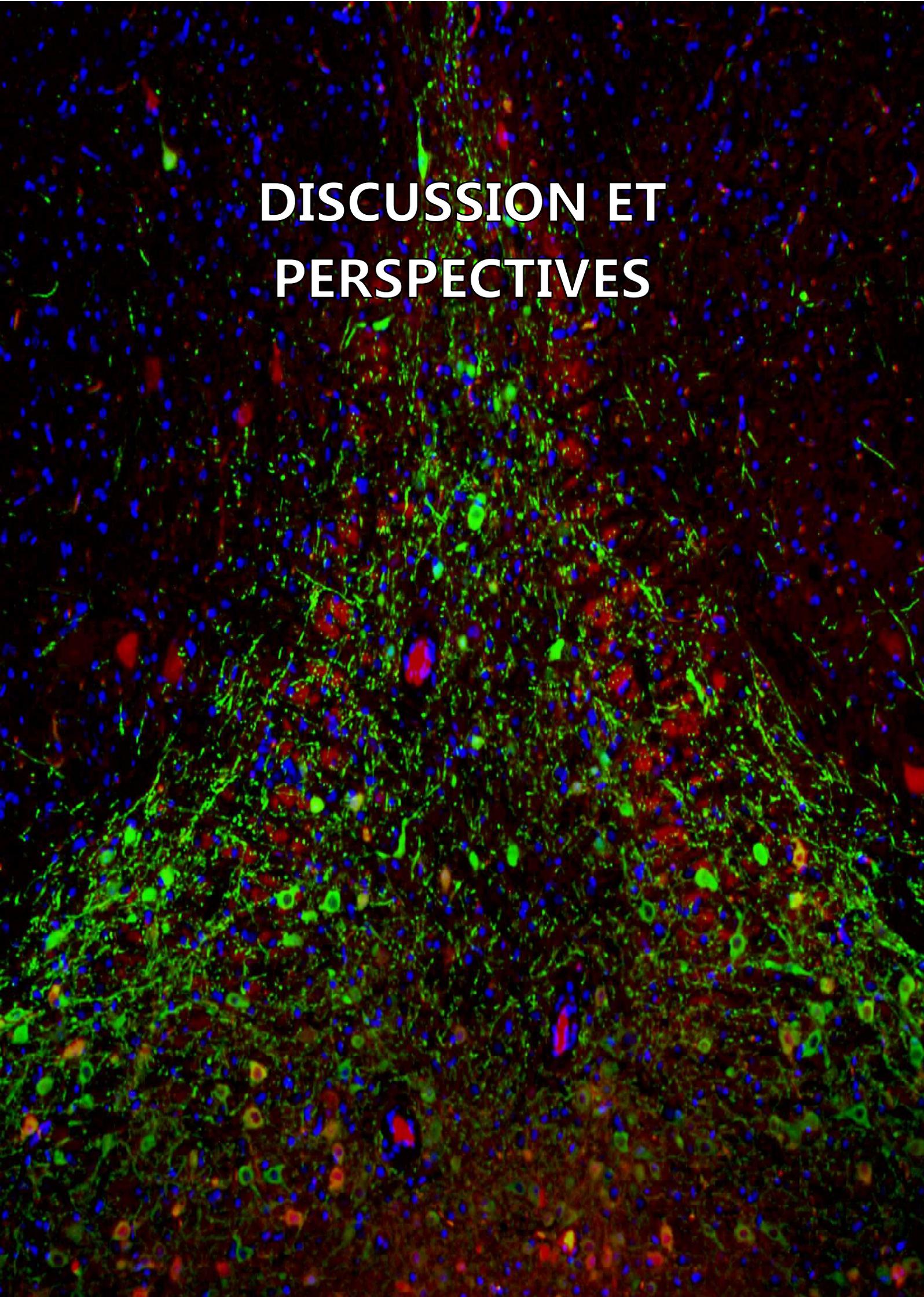
9. Poulain, B.; Humeau, Y. Le mode d'action des neurotoxines botuliques: aspects pathologiques, cellulaires et moléculaires. *Ann. Réadapt. Médecine Phys.* **2003**, *46*, 265–275, doi:10.1016/S0168-6054(03)00114-4.
10. Singh, B.R.; Kukreja, R. The Botulinum Toxin as a Therapeutic Agent: Molecular and Pharmacological Insights. *Res. Rep. Biochem.* **2015**, *173*, doi:10.2147/RRBC.S60432.
11. Zhang, S.; Masuyer, G.; Zhang, J.; Shen, Y.; Lundin, D.; Henriksson, L.; Miyashita, S.-I.; Martínez-Carranza, M.; Dong, M.; Stenmark, P. Identification and Characterization of a Novel Botulinum Neurotoxin. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, doi:10.1038/ncomms14130.
12. Peng Chen, Z.; Morris, J.; Rodriguez, R.; Shukla, A.; Tapia-Núñez, J.; Okun, M. Emerging Opportunities for Serotypes of Botulinum Neurotoxins. *Toxins* **2012**, *4*, 1196–1222, doi:10.3390/toxins4111196.
13. Fonfria, E. Botulinum Neurotoxin: A Multifunctional Protein for the Development of New Therapeutics. In *Neurotoxins*; McDuffie, J.E., Ed.; InTech, 2018 ISBN 978-1-78923-168-7.
14. Elliott, M.; Favre-Guilmard, C.; Liu, S.M.; Maignel, J.; Masuyer, G.; Beard, M.; Boone, C.; Carré, D.; Kalinichev, M.; Lezmi, S.; et al. Botulinum Neurotoxin B Engineered for Increased Receptor Affinity Has Improved Clinical Potential. *Toxicon* **2018**, *156*, S27–S28, doi:10.1016/j.toxicon.2018.11.070.
15. Nepal, M.R.; Jeong, T.C. Alternative Methods for Testing Botulinum Toxin: Current Status and Future Perspectives. *Biomol. Ther.* **2020**, *28*, 302–310, doi:10.4062/biomolther.2019.200.
16. Hobbs, R.J.; Thomas, C.A.; Halliwell, J.; Gwenin, C.D. Rapid Detection of Botulinum Neurotoxins—A Review. *Toxins* **2019**, *11*, 418, doi:10.3390/toxins11070418.
17. Pellett, S. Progress in Cell Based Assays for Botulinum Neurotoxin Detection. In *Botulinum Neurotoxins*, Rummel, A., Binz, T., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013; Vol. 364, pp. 257–285 ISBN 978-3-642-33569-3.
18. Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **2007**, *131*, 861–872, doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.
19. Yamanaka, S. Induced Pluripotent Stem Cells: Past, Present, and Future. *Cell Stem Cell* **2012**, *10*, 678–684, doi:10.1016/j.stem.2012.05.005.
20. Yu, J.; Vodyanik, M.A.; Smuga-Otto, K.; Antosiewicz-Bourget, J.; Frane, J.L.; Tian, S.; Nie, J.; Jonsdottir, G.A.; Ruotti, V.; Stewart, R.; et al. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* **2007**, *318*, 1917–1920, doi:10.1126/science.1151526.
21. Umbach, J.A.; Adams, K.L.; Gundersen, C.B.; Novitch, B.G. Functional Neuromuscular Junctions Formed by Embryonic Stem Cell-Derived Motor Neurons. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e36049, doi:10.1371/journal.pone.0036049.
22. Martin, N.R.W.; Passey, S.L.; Player, D.J.; Mudera, V.; Baar, K.; Greensmith, L.; Lewis, M.P. Neuromuscular Junction Formation in Tissue-Engineered Skeletal Muscle Augments Contractile

- Function and Improves Cytoskeletal Organization. *Tissue Eng. Part A* **2015**, *21*, 2595–2604, doi:10.1089/ten.tea.2015.0146.
23. Santhanam, N.; Kumanchik, L.; Guo, X.; Sommerhage, F.; Cai, Y.; Jackson, M.; Martin, C.; Saad, G.; McAleer, C.W.; Wang, Y.; et al. Stem Cell Derived Phenotypic Human Neuromuscular Junction Model for Dose Response Evaluation of Therapeutics. *Biomaterials* **2018**, *166*, 64–78, doi:10.1016/j.biomaterials.2018.02.047.
24. Afshar Bakooshli, M.; Lippmann, E.S.; Mulcahy, B.; Iyer, N.; Nguyen, C.T.; Tung, K.; Stewart, B.A.; van den Dorpel, H.; Fuehrmann, T.; Shoichet, M.; et al. A 3D Culture Model of Innervated Human Skeletal Muscle Enables Studies of the Adult Neuromuscular Junction. *eLife* **2019**, *8*, doi:10.7554/eLife.44530.
25. Puttonen, K.A.; Ruponen, M.; Naumenko, N.; Hovatta, O.H.; Tavi, P.; Koistinaho, J. Generation of Functional Neuromuscular Junctions from Human Pluripotent Stem Cell Lines. *Front. Cell. Neurosci.* **2015**, *9*, doi:10.3389/fncel.2015.00473.
26. Osaki, T.; Uzel, S.G.M.; Kamm, R.D. On-Chip 3D Neuromuscular Model for Drug Screening and Precision Medicine in Neuromuscular Disease. *Nat. Protoc.* **2020**, *15*, 421–449, doi:10.1038/s41596-019-0248-1.
27. Nicoleau, C.; De Lamotte, J.D.; Raban, E.; Boude, E.; Noirmain, F.; Krupp, J. Assessment of Multiple HiPSC-Derived Models for Botulinum Neurotoxin Testing. *Toxicon* **2018**, *156*, S85, doi:10.1016/j.toxicon.2018.11.206.
28. Nicoleau, C.; Donald, S.; Pons, L.; De Lamotte, J.D.; Raban, E.; Fonfria, E.; Krupp, J. Translational Value of HiPSC-Derived Models for Botulinum Neurotoxin Research. *Toxicon* **2018**, *156*, S84–S85, doi:10.1016/j.toxicon.2018.11.205.
29. Pellett, S.; Tepp, W.H.; Johnson, E.A. Botulinum Neurotoxins A, B, C, E, and F Preferentially Enter Cultured Human Motor Neurons Compared to Other Cultured Human Neuronal Populations. *FEBS Lett.* **2019**, doi:10.1002/1873-3468.13508.
30. Schenke, M.; Schjeide, B.-M.; Püschel, G.P.; Seeger, B. Analysis of Motor Neurons Differentiated from Human Induced Pluripotent Stem Cells for the Use in Cell-Based Botulinum Neurotoxin Activity Assays. *Toxins* **2020**, *12*, 276, doi:10.3390/toxins12050276.
31. Duchesne de Lamotte, J.; Roqueviere, S.; Gautier, H.; Raban, E.; Bouré, C.; Fonfria, E.; Krupp, J.; Nicoleau, C. HiPSC-Derived Neurons Provide a Robust and Physiologically Relevant In Vitro Platform to Test Botulinum Neurotoxins. *Front. Pharmacol.* **2021**, *11*, doi:10.3389/fphar.2020.617867.
32. Steinbeck, J.A.; Choi, S.J.; Mrejeru, A.; Ganat, Y.; Deisseroth, K.; Sulzer, D.; Mosharov, E.V.; Studer, L. Optogenetics Enables Functional Analysis of Human Embryonic Stem Cell-Derived Grafts in a Parkinson's Disease Model. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 204–209, doi:10.1038/nbt.3124.
33. Garita-Hernandez, M.; Guibbal, L.; Toualbi, L.; Routet, F.; Chaffiol, A.; Winckler, C.; Harinquet, M.; Robert, C.; Fouquet, S.; Bellow, S.; et al. Optogenetic Light Sensors in Human Retinal Organoids. *Front. Neurosci.* **2018**, *12*, doi:10.3389/fnins.2018.00789.

34. Swartz, E.W.; Shintani, G.; Wan, J.; Maffei, J.S.; Wang, S.H.; Miller, B.L.; Havton, L.A.; Coppola, G. *Establishment of a Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neuromuscular Co-Culture Under Optogenetic Control*, Neuroscience, 2020;
35. Rao, L.; Qian, Y.; Khodabukus, A.; Ribar, T.; Bursac, N. Engineering Human Pluripotent Stem Cells into a Functional Skeletal Muscle Tissue. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, doi:10.1038/s41467-017-02636-4.
36. Maury, Y.; Côme, J.; Piskorowski, R.A.; Salah-Mohellibi, N.; Chevaleyre, V.; Peschanski, M.; Martinat, C.; Nedelec, S. Combinatorial Analysis of Developmental Cues Efficiently Converts Human Pluripotent Stem Cells into Multiple Neuronal Subtypes. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 89, doi:10.1038/nbt.3049.
37. Mamchaoui, K.; Trollet, C.; Bigot, A.; Negroni, E.; Chaouch, S.; Wolff, A.; Kandalla, P.K.; Marie, S.; Di Santo, J.; St Guily, J.; et al. Immortalized Pathological Human Myoblasts: Towards a Universal Tool for the Study of Neuromuscular Disorders. *Skelet. Muscle* **2011**, *1*, 34, doi:10.1186/2044-5040-1-34.
38. Hooker, A.; Palan, S.; Beard, M. Recombinant Botulinum Neurotoxin Serotype A1 (SXN102342): Protein Engineering and Process Development. *Toxicon* **2016**, *123*, S40, doi:10.1016/j.toxicon.2016.11.113.
39. Sala, L.; van Meer, B.J.; Tertoolen, L.G.J.; Bakkers, J.; Bellin, M.; Davis, R.P.; Denning, C.; Dieben, M.A.E.; Eschenhagen, T.; Giacomelli, E.; et al. MUSCLEMOTION: A Versatile Open Software Tool to Quantify Cardiomyocyte and Cardiac Muscle Contraction In Vitro and In Vivo. *Circ. Res.* **2018**, *122*, doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.312067.
40. Radstake, F.D.W.; Raaijmakers, E.A.L.; Luttge, R.; Zinger, S.; Frimat, J.P. CALIMA: The Semi-Automated Open-Source Calcium Imaging Analyzer. *Comput. Methods Programs Biomed.* **2019**, *179*, 104991, doi:10.1016/j.cmpb.2019.104991.
41. Regent, F.; Morizur, L.; Lesueur, L.; Habeler, W.; Plancheron, A.; Ben M'Barek, K.; Monville, C. Automation of Human Pluripotent Stem Cell Differentiation toward Retinal Pigment Epithelial Cells for Large-Scale Productions. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, doi:10.1038/s41598-019-47123-6.
42. Rossetto, O.; Pirazzini, M.; Montecucco, C. Botulinum Neurotoxins: Genetic, Structural and Mechanistic Insights. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *12*, 535–549, doi:10.1038/nrmicro3295.
43. Cameron, M.; Kékesi, O.; Morley, J.W.; Tapson, J.; Breen, P.P.; van Schaik, A.; Buskila, Y. Calcium Imaging of AM Dyes Following Prolonged Incubation in Acute Neuronal Tissue. *PLOS ONE* **2016**, *11*, e0155468, doi:10.1371/journal.pone.0155468.
44. Bhatt, J.M. The Epidemiology of Neuromuscular Diseases. *Neurol. Clin.* **2016**, *34*, 999–1021, doi:10.1016/j.ncl.2016.06.017.
45. Barbeau, S.; Tahraoui-Bories, J.; Legay, C.; Martinat, C. Building Neuromuscular Junctions *in Vitro*. *Development* **2020**, *147*, dev193920, doi:10.1242/dev.193920.

46. Steinbeck, J.A.; Jaiswal, M.K.; Calder, E.L.; Kishinevsky, S.; Weishaupt, A.; Toyka, K.V.; Goldstein, P.A.; Studer, L. Functional Connectivity under Optogenetic Control Allows Modeling of Human Neuromuscular Disease. *Cell Stem Cell* **2016**, *18*, 134–143, doi:10.1016/j.stem.2015.10.002.
47. Lin, C.-Y.; Yoshida, M.; Li, L.-T.; Ikenaka, A.; Oshima, S.; Nakagawa, K.; Sakurai, H.; Matsui, E.; Nakahata, T.; Saito, M.K. iPSC-Derived Functional Human Neuromuscular Junctions Model the Pathophysiology of Neuromuscular Diseases. *JCI Insight* **2019**, *4*, doi:10.1172/jci.insight.124299.
48. Osaki, T.; Uzel, S.G.M.; Kamm, R.D. Microphysiological 3D Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) from Human IPS-Derived Muscle Cells and Optogenetic Motor Neurons. *Sci. Adv.* **2018**, *4*, eaat5847, doi:10.1126/sciadv.aat5847.
49. Vila, O.F.; Uzel, S.G.M.; Ma, S.P.; Williams, D.; Pak, J.; Kamm, R.D.; Vunjak-Novakovic, G. Quantification of Human Neuromuscular Function through Optogenetics. *Theranostics* **2019**, *9*, 1232–1246, doi:10.7150/thno.25735.
50. Sebillé, S.; Ayad, O.; Chapotte-Baldacci, C.-A.; Cognard, C.; Bois, P.; Chatelier, A. Optogenetic Approach for Targeted Activation of Global Calcium Transients in Differentiated C2C12 Myotubes. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, doi:10.1038/s41598-017-11551-z.
51. Chen, T.-W.; Wardill, T.J.; Sun, Y.; Pulver, S.R.; Renninger, S.L.; Baohan, A.; Schreiter, E.R.; Kerr, R.A.; Orger, M.B.; Jayaraman, V.; et al. Ultrasensitive Fluorescent Proteins for Imaging Neuronal Activity. *Nature* **2013**, *499*, 295–300, doi:10.1038/nature12354.
52. Marteyn, A.; Maury, Y.; Gauthier, M.M.; Lecuyer, C.; Vernet, R.; Denis, J.A.; Pietu, G.; Peschanski, M.; Martinat, C. Mutant Human Embryonic Stem Cells Reveal Neurite and Synapse Formation Defects in Type 1 Myotonic Dystrophy. *Cell Stem Cell* **2011**, *8*, 434–444, doi:10.1016/j.stem.2011.02.004.
53. Koirala, S.; Reddy, L.V.; Ko, C.-P. Roles of Glial Cells in the Formation, Function, and Maintenance of the Neuromuscular Junction. *J. Neurocytol.* **2003**, *32*, 987–1002, doi:10.1023/B:NEUR.0000020637.71452.3c.
54. Darabid, H.; Perez-Gonzalez, A.P.; Robitaille, R. Neuromuscular Synaptogenesis: Coordinating Partners with Multiple Functions. *Nat. Rev. Neurosci.* **2014**, *15*, 703–718.
55. Natarajan, A.; Sethumadhavan, A.; Krishnan, U.M. Toward Building the Neuromuscular Junction: In Vitro Models To Study Synaptogenesis and Neurodegeneration. *ACS Omega* **2019**, *4*, 12969–12977, doi:10.1021/acsomega.9b00973.
56. Hudson, A.E. Genetic Reporters of Neuronal Activity: c-Fos and G-CaMP6. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 2018; Vol. 603, pp. 197–220 ISBN 978-0-12-814574-6.
57. Chung, L. A Brief Introduction to the Transduction of Neural Activity into Fos Signal. *Dev. Reprod.* **2015**, *19*, 61–67, doi:10.12717/DR.2015.19.2.061.
58. Bullitt, E. Expression Of c-Fos-like Protein as a Marker for Neuronal Activity Following Noxious Stimulation in the Rat. *J. Comp. Neurol.* **1990**, *296*, 517–530, doi:10.1002/cne.902960402.

59. Clements, I.P.; Millard, D.C.; Nicolini, A.M.; Preyer, A.J.; Grier, R.; Heckerling, A.; Blum, R.A.; Tyler, P.; McSweeney, K.M.; Lu, Y.-F.; et al. Optogenetic Stimulation of Multiwell MEA Plates for Neural and Cardiac Applications.; Madsen, S.J., Yang, V.X.D., Jansen, E.D., Luo, Q., Mohanty, S.K., Thakor, N.V., Eds.; San Francisco, California, United States, March 9 2016; p. 96902C.
60. Welkenhuysen, M.; Hoffman, L.; Luo, Z.; De Proft, A.; Van den Haute, C.; Baekelandt, V.; Debyser, Z.; Gielen, G.; Puers, R.; Braeken, D. An Integrated Multi-Electrode-Optrode Array for in Vitro Optogenetics. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, doi:10.1038/srep20353.
61. Guo, X.; Gonzalez, M.; Stancescu, M.; Vandeburgh, H.H.; Hickman, J.J. Neuromuscular Junction Formation between Human Stem Cell-Derived Motoneurons and Human Skeletal Muscle in a Defined System. *Biomaterials* **2011**, *32*, 9602–9611, doi:10.1016/j.biomaterials.2011.09.014.

A fluorescence microscopy image of a neural network. The image shows a dense field of neurons with green and red staining, and blue staining highlighting nuclei. The neurons are interconnected, forming a complex network. The text "DISCUSSION ET PERSPECTIVES" is overlaid in white, bold, uppercase letters in the upper center of the image.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'identification d'une source cellulaire alternative aux cultures primaires de neurones de rongeurs ou aux cellules humaines cancéreuses ou immortalisées, ainsi qu'aux modèles animaux jusque-là utilisés couramment pour l'étude des neurotoxines botuliques, est un enjeu majeur du développement de nouvelles thérapeutiques à base de neurotoxines botuliques (BoNT). La découverte des cellules souches pluripotentes humaines, et particulièrement les cellules souches pluripotentes induites (CSPi) humaines, a ouvert des perspectives innovantes et compétitives dans ce domaine. Mes travaux de thèse s'inscrivent dans ce contexte scientifique. Au cours de ces années de recherche, il m'a été possible de mettre au point des modèles pertinents basés sur l'utilisation des CSPi humaines, et plus précisément de leurs dérivés neuronaux, pour évaluer l'effet des neurotoxines botuliques dans un contexte humain avec l'espoir d'une valeur prédictive accrue pour la clinique.

I. Des cellules souches pluripotentes induites humaines aux populations neuronales : clés de l'étude des BoNT

A. Potentiel des neurones dérivés de cellules souches pluripotentes induites humaines

Les BoNT, connues pour cliver les protéines SNARE dans les neurones, inhibent la libération des neurotransmetteurs au niveau de la jonction neuromusculaire (JNM), entraînant ainsi la paralysie musculaire caractéristique du botulisme. L'intoxication des BoNT se faisant principalement au sein des neurones, plusieurs équipes de recherche dont celle du laboratoire IPSEN se sont particulièrement intéressées à la détection des BoNT et à l'évaluation de leur sensibilité dans les neurones humains. Le potentiel des tests cellulaires utilisant des neurones moteurs dérivés de CSPi humaines pour les études sur les BoNT a été démontré pour la première fois par le laboratoire IPSEN (Nicoleau et al., 2018a). Les données issues de ces travaux ont été comparées à celles provenant d'un test utilisant des cultures primaires de neurones issus de moelle épinière de rats embryonnaires (Donald et al., 2018) et à celles provenant d'une étude chez l'homme (Nicoleau et al., 2018b; Pons et al., 2019). Cette dernière a montré, qu'à dose équivalente, les BoNT de sérotypes A et E (BoNTA et BoNT/E) injectées dans un muscle du pied entraînaient une inhibition de la commande motrice chez l'homme à hauteur de 70%. Les données cellulaires des neurones moteurs dérivés de CSPi humaines ont révélé une puissance égale des BoNT/A et BoNT/E, alors que les données du test standard sur les neurones dérivés de rat avaient suggéré que l'activité de la BoNT/A était supérieure à celle de la BoNT/E. De façon intéressante, l'activité de la BoNT/A était similaire entre les deux systèmes

cellulaires, d'espèce différentes mais pas celle de la BoNT/E, suggérant une spécificité d'espèce. Ces études ont donc permis de mettre en évidence le fait que le test utilisant des neurones dérivés de CSPi humaines prédisaient plus efficacement les effets cliniques des BoNT que le test utilisant des neurones de la moelle épinière de rats embryonnaires, et donc souligné l'importance et la valeur translationnelle des modèles dérivés de CSPi humaines pour le développement thérapeutique des BoNT.

De plus, les équipes du laboratoire IPSEN ont également évalué le potentiel d'autres modèles neuronaux dérivés de CSPi humaines en mesurant la sensibilité de ces sous-types neuronaux à différents sérotypes de BoNT. En effet, les indications thérapeutiques des BoNT pouvant être multiples, il était intéressant de constater si les potentielles cibles cellulaires pouvaient avoir une réponse différente en fonction des BoNT. En ce sens, plusieurs sous-types neuronaux dérivés de CSPi tels que les neurones moteurs, les neurones glutamatergiques, les neurones GABAergiques et les neurones périphériques ont été comparés (Duchesne de Lamotte et al., 2021; Nicoleau et al., 2018a). Après plusieurs jours de culture, chaque modèle exprime les récepteurs de surface et les protéines SNARE nécessaires à l'intoxication des BoNT avec cependant des niveaux d'expression différents en fonction de leur phénotype respectif. Chaque modèle était sensible aux deux sérotypes de BoNT testés (BoNT/A et BoNT/E) avec un différentiel de sensibilité non négligeable entre les sous-types neuronaux. Un ordre de sensibilité a donc été établi : neurones moteurs > neurones GABAergiques > neurones glutamatergiques/neurones périphériques. Ce différentiel observé pourrait être expliqué par le niveau d'expression différent des récepteurs aux BoNT et des protéines SNARE par chacun des phénotypes neuronaux étudiés, mais pourrait aussi être le reflet de différences intrinsèques dû au phénotype respectif des modèles neuronaux. L'utilisation de différents types neuronaux ouvre la porte à de nouvelles applications. En effet, les neurones périphériques ou glutamatergiques pourraient représenter des cibles de choix pour les BoNT pour diverses indications de troubles du système nerveux central et périphérique. D'autres sous-types neuronaux, tels que les neurones sensoriels, pourraient également être de nouvelles cibles pour traiter la douleur par exemple.

Le potentiel des cultures de neurones issus de CSPi humaines, en particulier des neurones moteurs, pour tester et caractériser les BoNTs, a en parallèle été confirmé dans d'autres études (Pellett et al., 2019; Schenke et al., 2020). Ces dernières ont confirmé que les neurones moteurs étaient les modèles les plus sensibles à la BoNT/A notamment. Cependant, ces études ont révélé un écart de sensibilité par rapport aux études réalisées par les équipes du laboratoire IPSEN sur les

neurones moteurs. Ces écarts peuvent être dus à plusieurs raisons. D'une part, la nature des BoNT utilisées est différente, *Pellett et al.* ainsi que *Schenke et al.* ont utilisé des BoNT produites par *Clostridium* alors que les équipes d'IPSEN ont conçu et utilisé une BoNT recombinante produite par *E.Coli*. D'autre part, la durée d'exposition des neurones moteurs aux toxines ne sont pas les mêmes, 48h pour *Pellett et al.* et *Schenke et al.* contre 24h pour les études des équipes d'IPSEN..

Les neurones moteurs représentent aujourd'hui le modèle le plus pertinent physiologiquement pour étudier les BoNT et leurs activités sur la contraction musculaire. Cependant, pour étudier pleinement le processus d'intoxication des BoNT et pour augmenter la pertinence des modèles, il est impératif d'associer les neurones moteurs avec des cellules musculaires pour modéliser le plus fidèlement possible la JNM.

B. Stratégie de coculture

Les systèmes de coculture cellulaire sont devenus des outils indispensables pour modéliser des systèmes complexes et augmenter la pertinence physiologique des modèles d'étude *in vitro*. La génération de cocultures par contact physique de plusieurs types cellulaires permet évidemment d'expérimenter les modes d'interaction entre ces types cellulaires. Cependant, lorsque la pertinence physiologique du modèle de culture augmente, le degré de contrôle sur le système expérimental diminue. Choisir le modèle de culture approprié est donc primordial pour chaque question de recherche (Figure 39). Le modèle classiquement préféré est le système de coculture 2D.

Les systèmes de coculture 2D sont simples à mettre en place, reproductibles, facilement observables et analysables, et le contrôle de leur environnement est aisé. La mise en coculture des cellules dans ce type de système permet d'étudier les contacts et les sécrétions médiées par les interactions cellulaires, mais les contacts cellules-cellules s'en retrouvent tout de même limités. L'un des avantages de ce type de coculture est la possibilité de générer les différents types cellulaires composant la coculture de façon différée dans le temps. Ceci permet par exemple lors de tests impliquant des infections virales ou bien lors d'ajout d'indicateurs spécifiques d'un type cellulaire, de pouvoir le faire en premier lieu dans le premier type cellulaire de la coculture avant que l'autre type cellulaire soit mis en coculture, ou bien de le faire après que la mise en coculture des différents types cellulaires ait été réalisée. Les puces microfluidiques permettent d'ajouter un degré de contrôle supplémentaire au système de coculture 2D grâce à l'isolation fluide des compartiments pré et

post-synaptiques, mais cela se fait au détriment du débit (Gribaudo et al., 2019). Cependant, la compatibilité avec les systèmes *in vivo* est diminuée mais n'en reste pas moins prédictive. Cependant, un tel système de culture ne reflète pas entièrement la situation *in vivo*, où les cellules se développent dans un microenvironnement complexe. Les cocultures 3D ont ainsi été introduites afin d'améliorer les interactions cellules-cellules et cellules-microenvironnement.

L'intérêt des coculture 3D réside principalement dans la proximité des différents types cellulaires les uns avec les autres ce qui s'apparente aux comportements observés *in vivo*, et dans la représentation plus précise de la cytoarchitecture. Toutefois, les cocultures 3D présentent des limitations notamment dans la diffusion de l'oxygène et d'autres éléments nutritifs essentiels pour la croissance, le maintien et la survie des cellules. Il faut également noter que l'utilisation des systèmes de coculture 3D dans différents champs de recherches est accompagnée de défis techniques pour la microscopie par exemple, mais également pour les tests à haut débit. Ainsi, considérant que les systèmes 2D s'analysent plus commodément, les systèmes 3D doivent encore être optimisés.

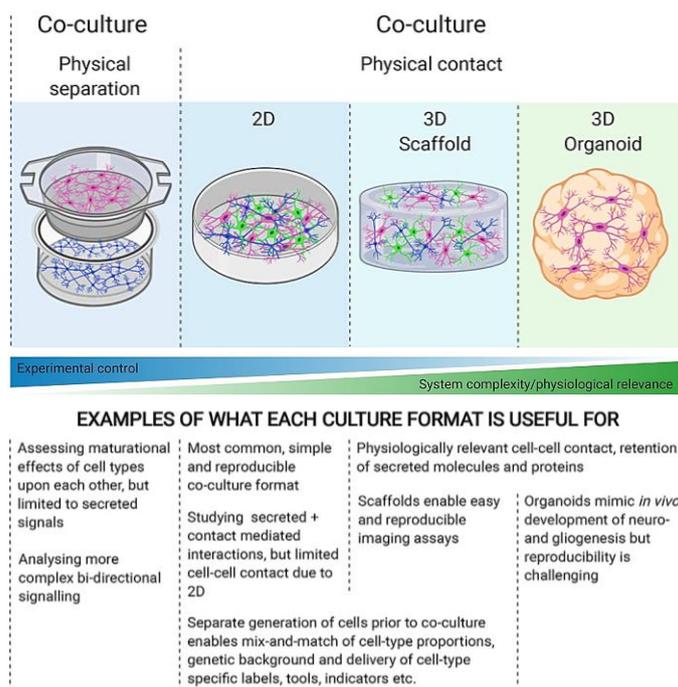


Figure 39. Cocultures 2D vs 3D (Hedegaard et al., 2020b)

Les différents environnements de culture entre les systèmes 2D et 3D véhiculent différents niveaux de contrôle expérimental et de pertinence physiologique.

Dans un contexte de découverte de médicaments, les systèmes de culture 2D sont les plus couramment utilisés (Costa et al., 2016). Les systèmes 2D ont contribué à la découverte de nombreux processus biologiques et pathologiques, mais ils ne sont pas capables de reproduire le microenvironnement complexe des cellules au sein des tissus. La découverte de médicaments repose sur la compréhension du lien entre les cellules et le microenvironnement dans lequel elles interagissent. Les composants des matrices extracellulaires jouent des rôles clés dans la régulation de la prolifération, migration, différenciation, et survie des cellules (Bonnans et al., 2014). Ces divers composants peuvent affecter la réponse des cellules aux médicaments en modulant leur mécanisme d'action, en amplifiant leur efficacité ou en augmentant la résistance des cellules. Les cellules cocultivées en 3D ont montré dans certaines études des réponses différentes aux médicaments par rapport aux cellules cultivées en 2D, dues aux différences de propriétés physiques et physiologiques entre les systèmes 2D et 3D (Langhans, 2018).

La plupart des tests utilisant des dérivés de CSPi sont des essais reposant sur la quantification de l'une des cibles spécifiques des BoNT, ce qui aujourd'hui ne permet pas la comparaison des BoNT clivant différentes protéines SNARE. Le développement de modèles de coculture intégrant des dérivés de CSPi permettrait de tester et de comparer différents sérotypes de BoNT dans les systèmes physiologiques pertinents. Plusieurs protocoles permettant de différencier les CSPi sont maintenant disponibles pour la génération de neurones fonctionnels qui peuvent être incorporés dans des systèmes synaptiques physiologiques.

II. De la modélisation des systèmes synaptiques à l'étude de la fonctionnalité

La modélisation de la transmission synaptique est une tâche difficile du fait de sa plasticité continue et de son dynamisme. Les connexions synaptiques sont multiples entre les neurones, et entre un neurone et une cellule cible. En tant que telles, les synapses sont des unités fondamentales des circuits neuronaux et assurent des comportements complexes. D'autre part, les cellules non neuronales, en particulier les cellules gliales (cellules de Schwann ou astrocytes) participant à la fonction et à l'homéostasie de la synapse, méritent idéalement de figurer dans les systèmes de coculture.

A. Choix de la synapse pour l'étude des BoNT

La JNM représente la synapse la plus étudiée ce qui a grandement contribué à la compréhension des principes généraux de la synaptogénèse et au développement de stratégies thérapeutiques potentielles pour les pathologies neuromusculaires et neurodégénératives en autres pour lesquelles il existe actuellement peu d'options thérapeutiques. Les CSPi étant très prometteuses pour la recherche translationnelle sur les troubles neurologiques (Devine and Patani, 2017; Silva and Haggarty, 2020), la modélisation de la JNM avec des composantes pré et post-synaptiques pourrait fournir un système précieux pour étudier les effets directs et conditionnels de signaux. La JNM est aujourd'hui la synapse de choix pour l'étude des BoNT. Cependant, malgré les progrès majeurs réalisés dans la génération de cellules dérivées de CSPi et dans protocoles de coculture modélisant la JNM *in vitro*, ces JNM restent immatures et instables par rapport aux JNM *in vivo*. En effet, les cocultures entre des neurones moteurs et des cellules musculaires dérivés de CSPi peuvent durer jusqu'à un mois, en raison des conditions de culture sous-optimales ne représentant pas microenvironnement dont chaque cellule a besoin. D'autre part, la majorité des cocultures de JNM *in vitro* ne compte pas la présence des cellules terminales de Schwann qui sont essentielles au bon développement et fonctionnement des JNM. Des études ont démontré l'effet bénéfique de ces cellules sur la fonction neuronale dans des cocultures (Hyung et al., 2015; Ullian et al., 2004). De ce fait, une tri-culture comportant des neurones moteurs, des cellules musculaires et des cellules terminales de Schwann permettrait de générer une JNM *in vitro* structurellement et physiologiquement plus précise. Dans le contexte de l'étude des BoNT, ce système de culture plus complexe mais plus physiologique augmenterait la pertinence du modèle pour l'étude des effets des BoNT. Les réponses fonctionnelles que nous avons pu observer dans les cellules musculaires innervées par les neurones moteurs lors de nos travaux de recherche sur notre système de synapse neuromusculaire, pourraient être potentialisées par la présence des cellules terminales de Schwann. La puissance des toxines sur les systèmes de JNM *in vitro* pourrait elle aussi être potentialisée et encore plus prédictive pour la clinique. Par conséquent, pour faciliter la découverte de médicaments, nous devons être capables d'évaluer la fonctionnalité de la JNM en utilisant des systèmes à haut débit. L'incorporation de nouvelles techniques telles que l'optogénétique permet un contrôle et une évaluation précise de la fonction des JNM dans des états sains mais aussi malades. Nos travaux de recherche sur le système neuromusculaire ont permis de confirmer l'importance des analyses fonctionnelles synaptiques pour l'étude des BoNT dans un système contrôlé par optogénétique.

Nous avons pu établir une preuve de concept du développement d'une nouvelle mesure pour évaluer l'effet des BoNT sur un modèle humain fonctionnel *in vitro* mimant la JNM. La combinaison de toutes ces avancées permet ainsi de générer des systèmes à haut débit pour le développement de nouveaux médicaments. Il pourrait être intéressant de combiner des systèmes de JNM *in vitro* avec des appareils de mesure de nouvelle génération permettant des mesures à haut débit. Par exemple, la compagnie *Axion Biosystems* a mis au point un dispositif sous forme de couvercle de diffusion de la lumière à différentes longueurs d'onde, afin de stimuler optiquement les cellules dans chacun des puits d'une plaque de culture. Ce système peut être associé avec un dispositif de MEA de sorte à stimuler les cellules avec la lumière et à en mesurer la réponse électrophysiologique (Clements et al., 2016). De la même façon, la compagnie Hamamatsu a récemment implémenté des outils optogénétiques à l'un de ses lecteurs automatiques de plaque de culture, dans le but de stimuler automatiquement les cellules et de lire grâce à une caméra spécifique le signal calcique généré en réponse à la stimulation (Bub and Daniels, 2020).

Bien que la cible naturelle des BoNT soit la JNM, les actions des BoNT s'étendent au système nerveux central où elles peuvent être acheminées directement pour bloquer l'exocytose de plusieurs neurotransmetteurs (glutamate, GABA, noradrénaline, sérotonine, dopamine) entraînant un silence quasi complet des réseaux neuronaux (Bozzi et al., 2006). L'utilisation des BoNT dans le système nerveux central permet d'étudier spécifiquement le rôle de l'activité synaptique dans différents processus physiologiques et pathologiques. Les propriétés des BoNT peuvent être exploitées par exemple pour lutter contre l'hyperactivité pathologique et les crises d'épilepsie dans des foyers cérébraux épileptogènes (Costantin, 2005), ou pour étudier le rôle de l'activité des BoNT dans les maladies dégénératives comme la maladie de Parkinson (Samotus et al., 2018), ou encore les maladies à prion (Caleo and Restani, 2018). Si l'on se penche d'un peu plus près sur l'épilepsie qui touche environ six millions de personnes en Europe, et dont environ 30% présentent une pharmacorésistance, des efforts pour découvrir de nouveaux traitements thérapeutiques sont justifiés et les BoNT pourraient être l'un d'eux (van Vliet et al., 2014). Dans ce contexte, l'étude des BoNT sur une synapse neuro-neuronale du système nerveux central prend tout son sens.

Comme mentionné dans l'introduction de ce travail, au cours des années de thèse nous nous sommes intéressés à la synapse cortico-corticale, et à l'effet des BoNT sur l'activité de cette synapse. Pour réaliser ce travail, nous avons utilisé deux modèles de neurones corticaux dérivés de CSPi : i) un modèle de neurones corticaux dérivée de CSPi de la lignée i90cl17 (Aubry et al., 2008) dont le

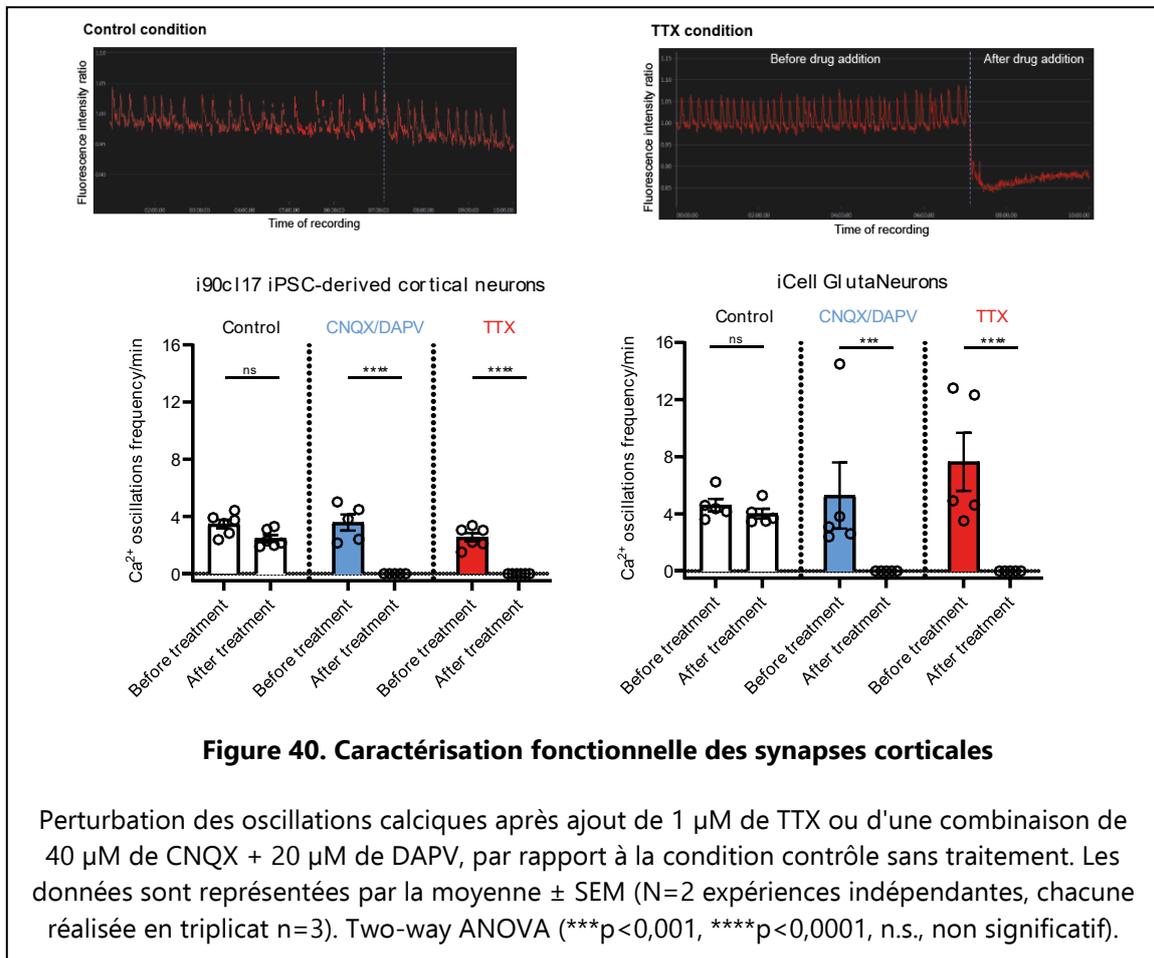
protocole de différenciation et de maturation a été développé par l'équipe du Dr Anselme Perrier et a démontré sa fonctionnalité (Gribaudo et al., 2019), ii) un modèle de neurones glutamatergiques commerciaux (« iCell GlutaNeurons », *Fujifilm Cellular Dynamics International*) dont le protocole de maturation est utilisé en routine au laboratoire IPSEN et qui a été validé auparavant comme modèle sensible aux BoNT (Duchesne de Lamotte et al., 2021; Nicoleau et al., 2018a). Par ailleurs, ces deux modèles ont démontré leur efficacité et leur reproductibilité dans des formats de culture miniaturisés allant de cultures en plaque 96 puits à 384 puits. Cette miniaturisation augmente la pertinence et la capacité de ces modèles à être utilisés pour des études dans un contexte de haut débit.

B. Etude des BoNT sur la synapse glutamatergique cortico-corticale

L'objectif de ce travail a été de mesurer et de comparer l'effet de deux BoNT, produites par le laboratoire IPSEN, sur la transmission synaptique mesuré par imagerie calcique d'un réseau synaptique de neurones corticaux dans un contexte de haut débit.

La première étape du travail a consisté à caractériser phénotypiquement et fonctionnellement les deux modèles de neurones corticaux utilisés. Les données ont montré que ces deux modèles exprimaient les marqueurs neuronaux (MAP2, Tuj1), les marqueurs synaptiques (PSD95) et les marqueurs spécifiques à leur identité corticale (VGLUT2, NMDAR1, GABA) en cohérence avec les données générées en utilisant ces mêmes modèles (Duchesne de Lamotte et al., 2021; Gribaudo et al., 2019). L'un des avantages des neurones corticaux est que leur activité synaptique basale finie par se synchroniser à l'échelle du puits de culture cellulaire ce qui permet d'effectuer des lectures d'intensité de variation de fluorescence de l'indicateur calcique sur puits entier, et donc à haut débit (Iida et al., 2018; Robinson et al., 1993). La mesure du flux calcique à haut débit a été rendue possible d'une part grâce à l'utilisation d'un indicateur calcique synthétique, le Cal520, connu pour améliorer significativement le ratio signal/bruit et la rétention intracellulaire par rapport aux autres indicateurs calciques existants, et d'autre part grâce à l'utilisation d'un lecteur de plaque puissant et rapide (FDSS, Hamamatsu). Afin d'analyser la fonction synaptique des cultures générées, nous avons étudié les oscillations calciques des neurones en quantifiant en particulier la fréquence moyenne des oscillations calciques sous trois conditions : condition contrôle sans traitement, traitement à la TTX (Tétradotoxine, bloqueur des canaux sodiques), traitement avec une combinatoire CNQX/DAPV (Cyanquixaline/D-2-amino-5-phosphonovalerate, respectivement antagonistes des récepteurs AMPA et NMDA). Les résultats ont mis en évidence que l'addition de TTX ou CNQX/DAPV

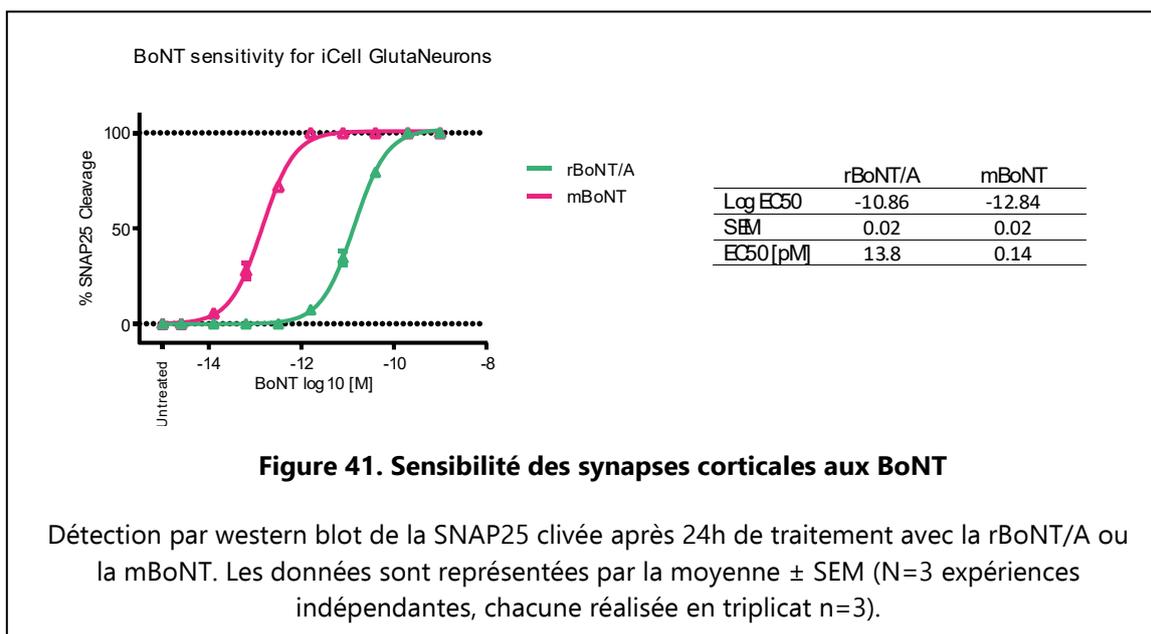
interrompait totalement la fréquence des oscillations calciques dans les deux modèles corticaux (Figure 40). Ces drogues inhibent ainsi l'activité synaptique de la même façon dans les deux modèles testés.



Pour la suite du travail, nous avons décidé de poursuivre les expérimentations uniquement sur le modèle de neurones corticaux commerciaux. En effet, malgré la similarité observée entre les deux modèles au niveau de la caractérisation phénotypique et fonctionnelle, la différence principale subsiste dans la durée de la culture. Le système cortical généré avec la lignée i90cl17 établit une synchronisation d'activité après 60 jours de culture, contre une trentaine de jours pour le système cortical établi avec les neurones commerciaux. Il semblait ainsi plus judicieux d'utiliser le modèle pour lequel la durée de culture est plus courte afin de réduire au maximum la durée du test et de réduire les aléas pouvant subvenir lors de cultures trop longues (mort cellulaire, prolifération, etc.).

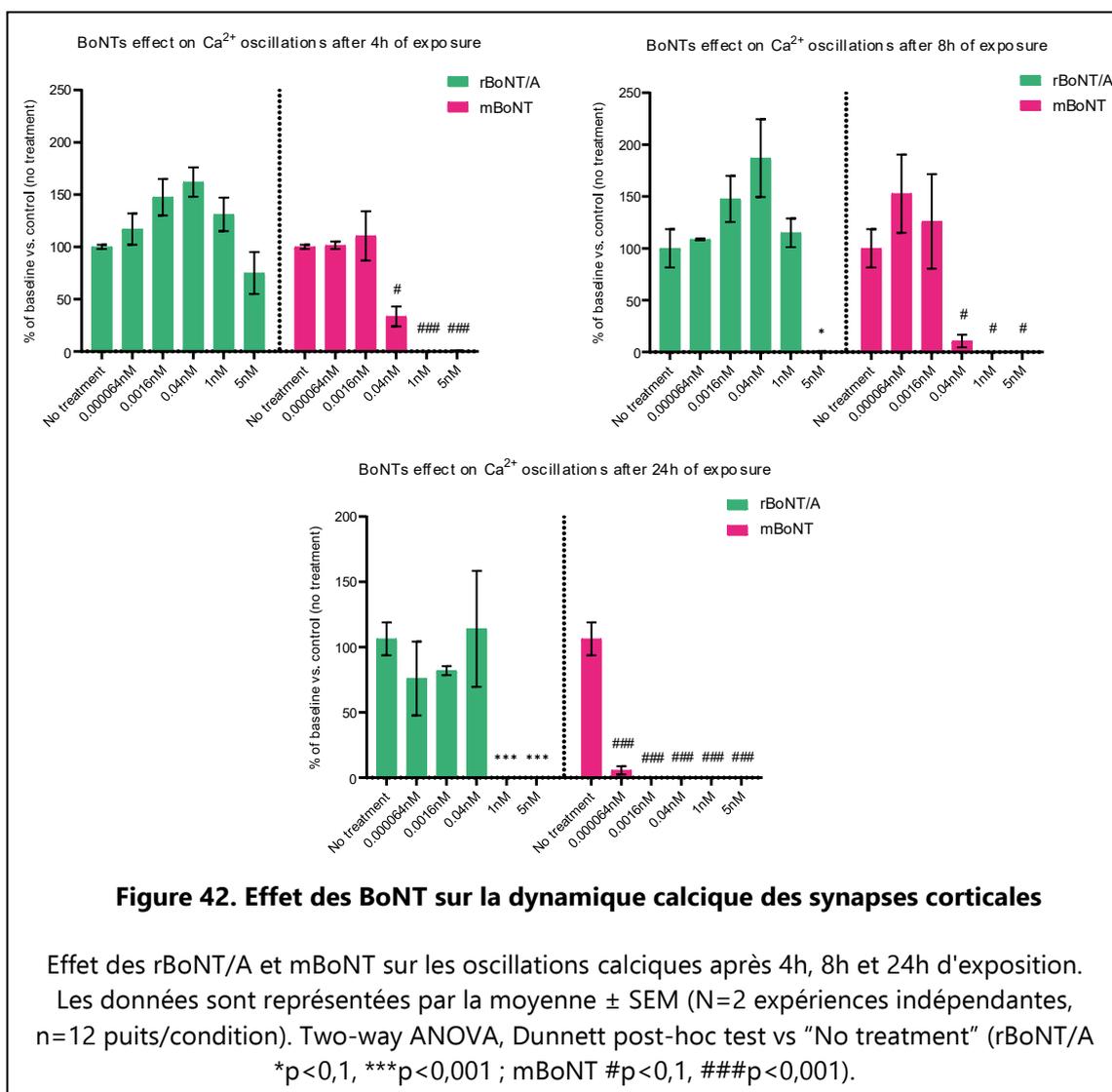
La deuxième étape du travail a consisté à évaluer la sensibilité du système cortical (« iCell GlutaNeurons ») aux deux neurotoxines produites par IPSEN et utilisées lors de notre étude sur le système neuromusculaire présenté dans la partie des travaux de recherche, à savoir la toxine

recombinante de référence rBoNT/A et une toxine modifiée mBoNT. Ces deux toxines ayant des mécanismes d'action différents (données confidentielles), notre hypothèse de départ fut naturellement de considérer que la sensibilité à ces deux neurotoxines serait différente. Pour évaluer cette sensibilité, nous avons réalisé un western blot quantifiant le pourcentage de substrat clivé par les BoNT, ici la protéine SNAP25, grâce à un anticorps spécifique reconnaissant les formes totale et clivée de la protéine. Les résultats ont confirmé notre hypothèse de départ. A doses équivalentes, le système cortical montre une sensibilité plus forte à la mBoNT qu'à la rBoNT/A : les EC₅₀ mesurés démontrent une puissance différentielle de 2 log (Figure 41). Ces observations mettent en évidence que la mBoNT présente une activité enzymatique plus puissante que la rBoNT/A.



Une fois le différentiel de sensibilité aux deux BoNT mis en évidence par l'évaluation du clivage de la protéine SNAP25, la dernière étape du travail a consisté à étudier l'effet de ces deux neurotoxines sur l'activité synaptique de notre modèle de synapse corticale humaine. Nous avons choisi d'évaluer l'impact de l'exposition de notre modèle aux BoNT sur l'activité synaptique telle que mesurée par imagerie calcique. Nous avons ainsi sélectionné cinq concentrations spécifiques de neurotoxines en adéquation avec les courbes dose-réponse générées précédemment, et nous avons enregistré le flux calcique avant, puis 4, 8 et 24 heures après l'exposition aux BoNT. L'enregistrement du flux calcique a été réalisé dans les mêmes conditions que lors de la première étape du travail (utilisation d'un indicateur calcique et lecture du flux à haut débit). Nous avons émis l'hypothèse que les BoNT diminueraient la fréquence des oscillations calciques avec une puissance différente et/ou

un décours temporel différent. Les résultats ont démontré : i) les deux BoNT diminuent la fréquence des oscillations calciques jusqu'à bloquer totalement les oscillations à forte dose, ii) la concentration nécessaire pour obtenir une même diminution de la fréquence est plus importante avec la rBoNT/A que la mBoNT quelle que soit la durée considérée, iii) à concentration égale la durée nécessaire pour obtenir la même diminution de la fréquence est plus importante avec la mBoNT, iv) le blocage total de la transmission synaptique 24 heures après traitement est obtenu pour une concentration bien inférieure de mBoNT que de rBoNT/A (Figure 42). Ces observations soulignent ainsi la pertinence de l'imagerie calcique comme méthode d'évaluation de l'effet généré par les deux BoNT sur notre modèle de synapse corticale.



Ce travail nous a permis de développer un nouveau test *in vitro* à fort potentiel basé sur l'utilisation de CSPi pour tester la puissance des BoNT et fournir un ensemble de données de preuve

de concept avec les BoNT dans un système synaptique fonctionnel. L'ensemble des données récoltées démontre les avantages d'un tel test : i) le haut débit dans un format miniaturisé qui est profitable à l'échelle industrielle, ii) la haute sensibilité qui permet la détection de très faibles concentrations de BoNT, iii) la nouvelle lecture pertinente de l'activité synaptique fonctionnelle basée sur l'analyse du flux calcique par comparaison avec la mesure biochimique du western blot, iv) la possibilité de tester un panel de BoNT en même temps en peu de temps, et v) la possibilité de tester des BoNT clivant des protéines SNARE différentes (SNAP, VAMP, syntaxine, YKT6). De l'optimisation reste cependant nécessaire, de sorte à établir complètement la robustesse et le débit maximal du test. Ce nouveau test cellulaire ouvre la porte à des perspectives de modélisation pathologique et de développement thérapeutique. En effet, la signalisation du calcium dépendant de l'activité, caractérisée ici, facilite l'implémentation d'une approche optogénétique ou par stimulation électrique. Cette approche permettrait par exemple de pouvoir contrôler entièrement le modèle synaptique cortical afin de le suractiver ou au contraire de le sous-activer jusqu'à l'inhiber, pour modéliser des pathologies comme les maladies neurodégénératives ou les troubles neurodéveloppementaux. Afin d'optimiser notre système, il pourrait également être intéressant de cultiver les neurones corticaux avec des astrocytes qui influencent la maturation et le fonctionnement des neurones en régulant l'environnement extracellulaire et la signalisation synaptique (Hedegaard et al., 2020a; Kuijlaars et al., 2016). Ce type de coculture augmenterait encore plus la pertinence physiologique du système.

C. Stratégies de mesure de la fonctionnalité : vers du haut débit

Le processus de découverte des médicaments est considéré comme inefficace pour de nombreuses pathologies malgré l'existence de pistes thérapeutiques potentielles. Lors du processus de développement d'un médicament, un grand nombre de molécules sont abandonnées au stade préclinique car les effets définitifs sont difficilement prévisibles (Lowenstein and Castro, 2009; Seyhan, 2019). Pour pallier ce problème, le développement de systèmes cellulaires plus sophistiqués qui imitent plus fidèlement les conditions physiologiques est nécessaire. La mise en place de tests plus sensibles et précis doit également être réalisée afin d'éliminer les molécules inefficaces ou toxiques avant qu'elles ne soient utilisées pour la phase clinique, ce qui augmente les chances de réussite finale.

Il existe actuellement des méthodes de contrôle électrophysiologique qui permettent de mesurer l'activité synaptique dans un système cellulaire, mais ces méthodes conviennent principalement à la recherche fondamentale et aux tests à bas débit. La technologie du MEA représente une alternative plus simple, moins longue et moins coûteuse par rapport aux techniques conventionnelles. Les outils MEA développés depuis ces dernières années tendent à augmenter le nombre de canaux ou d'électrodes de mesure pour l'enregistrement et la stimulation simultanés, ce qui accroît considérablement le nombre de données générées et l'automatisation de l'acquisition des données. Un effort est également fait en termes de miniaturisation de la technologie afin d'enregistrer de 48 à 96 puits de plaque de culture cellulaire en parallèle, ce qui augmente considérablement le débit de ce type de test (Cotterill et al., 2016; Eichler et al., 2015). Il est bien établi que les neurones cultivés en MEA forment des réseaux où les potentiels d'action extracellulaire peuvent être surveillés de manière non invasive pour quantifier les effets fonctionnels des composés modulant la neurotransmission (Pancrazio et al., 2014). Cette technologie représente un avantage pour l'étude des BoNT sur la transmission synaptique. Des études de MEA ont déjà permis d'évaluer sur des modèles *in vitro* l'altération de la transmission synaptique par la BoNT/A dépendante de la concentration utilisées et du temps (Jenkinson et al., 2017). Cette méthode a permis de détecter une inhibition de la transmission synaptique des BoNTs dépendant de la dose et du temps. Les mesures de MEA peuvent ainsi fournir des informations fonctionnelles importantes pour établir des traitements médicamenteux à base de BoNT. Par ailleurs, en combinant cette technologie avec des modèles cellulaires plus complexes comme les modèles de coculture plus représentatifs de la physiologie humaine (neurones moteurs/muscle, neurones corticaux/astrocytes, neurones corticaux/neurones moteurs, neurones corticaux/neurones striataux, etc.), les mesures de MEA en seraient encore plus pertinentes et efficaces.

L'autre technologie prometteuse pour du haut débit est l'optogénétique. Comme nous l'avons démontré dans nos travaux de recherches sur le système neuromusculaire, implémenter des outils optogénétiques à un tel système permet d'en prendre le contrôle pour étudier tous les aspects de la transmission synaptique entre les composantes pré et post-synaptiques. Les fonctions électrophysiologiques et électrochimiques de l'éléments présynaptique notamment peuvent ainsi être manipulées. Bien que cette méthode soit prometteuse, la mise en place peut être assez longue. En effet il est important d'adapter les outils génétiques au modèle cellulaire utilisé (variantes d'opsine adaptées, caractéristique de l'opsine, méthodes de vectorisation et niveau d'expression de l'opsine),

ainsi que les outils optiques (source et mode d'émission de lumière appropriés, caractéristiques de la stimulation, zone d'éclairage, durée et intensité) (Goncalves et al., 2017; Shen et al., 2020). Le développement des outils optogénétiques est en plein essor depuis ces dernières années, et ils tendent à l'avenir à devenir des outils puissants pour la modélisation des maladies et la découverte de médicaments. Les outils optogénétiques permettant de contrôler l'activité synaptique peuvent être utilisés dans plusieurs contextes : l'identification de la cible (identification de cibles médicamenteuses potentielles qui modulent l'activité synaptique, ou des cibles génétiques), le criblage basé sur la cible (comparaison des effets des médicaments sur l'activité synaptique), le criblage sélectif basé sur le phénotype cellulaire (comparaison des effets des médicaments sur différents sous-types de neurones par exemple, et enfin la classification des patients (comparaison des effets des médicaments sur l'activité des neurones dérivés de CSPi de patients par exemple) (Zhang and Cohen, 2017).

Cependant, un stimulus de l'élément présynaptique et une lecture de l'activité de l'élément post-synaptique simultanés sont nécessaires pour effectuer des mesures de la transmission synaptique au-delà de l'activité basale du système. En associant la stimulation optogénétique d'un variant du canal rhodopsine dans une cellule présynaptique à l'imagerie du calcium dans une cellule post-synaptique exprimant un indicateur calcique comme la GCaMP6f, on peut détecter les potentiels d'action des synapses excitatrices, mais aussi des synapses dont les neurones inhibiteurs sont connectés à des afférences excitatrices dans la même culture cellulaire (Förster et al., 2017). En outre, le ciblage génétique de la composante présynaptique et de la composante post-synaptique permet de mesurer de manière ciblée la transmission synaptique entre différents sous-types cellulaires. Cependant, il reste encore des défis techniques à relever avant de pouvoir profiter pleinement du potentiel que peut offrir la technologie optogénétique, particulièrement le contrôle à haut débit de la stimulation optogénétique. La majorité des optogènes et des indicateurs calciques génétiquement codés utilisés ont des spectres d'émission limités, la plupart étant couplés à la GFP ou à des protéines spectralement similaires. Ainsi, développer des optogènes possédant des spectres plus larges augmenterait le champ des applications possibles. Un autre défi est la quantification. En effet, la stimulation, la mesure optogénétique et l'intensité du signal dépendent du niveau d'expression de l'optogène et de l'indicateur calcique, de la surface de la membrane et de la distribution de l'intensité d'éclairage. Ces paramètres sont difficiles à connaître avec précision. En fin de compte, les mesures quantitatives proviennent d'une conception expérimentale soignée et des

conditions bien définies de culture cellulaire. Malgré ces défis, les outils optogénétiques restent une technologie prometteuse pour tester des futurs médicaments sur la modulation fonctionnelle des neurones en condition physiologique ou pathologique.

III. L'ingénierie des neurotoxines botuliques : vers une amélioration du potentiel thérapeutique

L'utilisation médicale des BoNT étant en constant essor, le potentiel de nouvelles améliorations de leur propriété enzymatique, leur demi-vie (résistance à la dégradation), leur liaison aux récepteurs, leur translocation entre autres sont de plus en plus examinés afin d'augmenter leur efficacité et de moduler leur durée d'action. De ce fait, il existe un intérêt considérable pour le développement de nouvelles formes de BoNT ayant des propriétés thérapeutiques optimisées et une sélectivité neuronale. Une approche d'ingénierie a été adoptée d'une part via la création des BoNT chimères entre plusieurs sérotypes de sorte à élargir le champ d'action de ces BoNT (Masuyer et al., 2014), et d'autre part via la modification des propriétés pharmacologiques des BoNT natives par le biais de mutations spécifiques, ouvrant la voie à la conception de variantes de BoNT aux propriétés nouvelles et utiles (Peck et al., 2017).

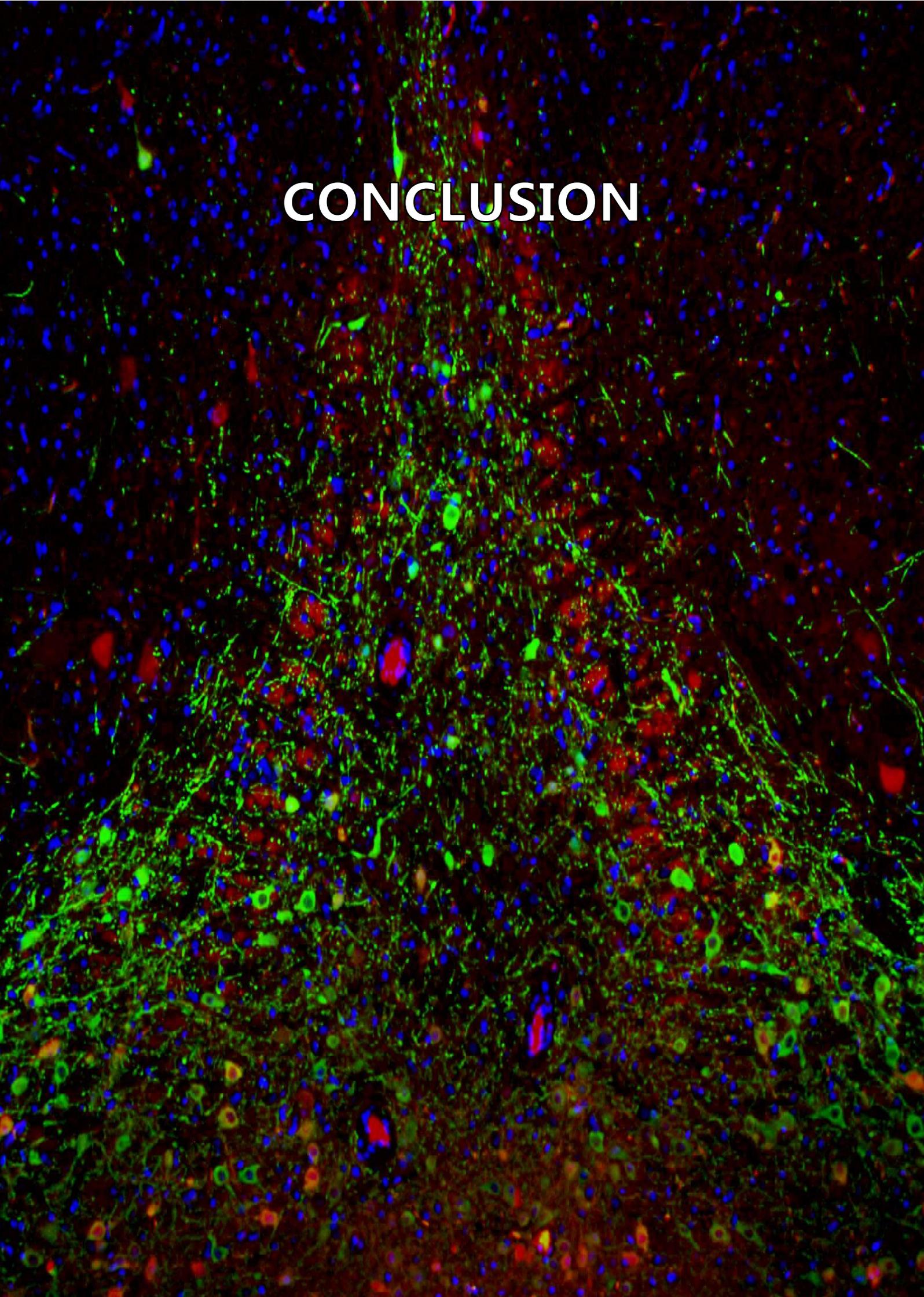
Les BoNT possèdent des domaines ayant des fonctions distinctes, notamment les domaines de liaison qui cible les terminaisons nerveuses, le domaine de translocation qui est utilisé comme charge pour délivrer la chaîne légère des BoNT, et la chaîne légère qui est impliquée dans le clivage de son substrat jouant un rôle dans la libération du neuromédiateur. Chacun de ces domaines peut être exploité et modifié afin de concevoir des BoNT hybrides sur mesure et dont l'activité s'en retrouve modulée (Dong and Stenmark, 2019; Masuyer et al., 2014). Par exemple, l'une des approches d'ingénierie des BoNT a consisté à combiner dans une BoNT hybride les chaînes légères des BoNT/A et BoNT/E afin de prolonger la durée du clivage de la protéine SNAP25 et donc l'effet de la BoNT. Ce clivage prolongé peut avoir des effets bénéfiques par exemple dans le traitement de la douleur chronique (Dolly et al., 2011; Wang et al., 2017). Un autre objectif de l'ingénierie des BoNT est d'augmenter son activité chez l'Homme. Par exemple, certaines mutations dans la BoNT/B ont permis d'améliorer sa liaison à son récepteur spécifique Syt-II, augmentant ainsi significativement le blocage de la neurotransmission en découlant (Tao et al., 2017). Les BoNT/B modifiées ont également montré une plus grande efficacité dans des modèles de souris transgéniques humanisées ayant une meilleure affinité pour les récepteurs hSyt-I et hSyt-II (Elliott et al., 2019). En effet, la BoNT/B reconnaît

spécifiquement les récepteurs Syt-I et Syt-II, ce dernier étant majoritaire au niveau de la JNM (Pang et al., 2006). Cependant, la BoNT/B présente une plus grande affinité avec l'homologue de rongeur Syt-II par rapport à l'homologue humain. L'augmentation de l'affinité aux récepteurs humains a induit une activité accrue dans tous les modèles qui expriment les isoformes Syt humains. En conséquence, les BoNT/B dont la liaison aux récepteurs humains a été améliorée sont plus efficaces dans les modèles précliniques.

Outre l'amélioration des propriétés pharmacologiques, un autre aspect de l'ingénierie des BoNT est d'étendre leurs applications à d'autres types cellulaires dont les cellules non neuronales et les neurones sensoriels. En effet ces autres types cellulaires utilisent un ensemble de protéines SNARE différent des cellules neuronales. C'est le cas de la protéine SNAP23 qui est impliquée dans de nombreux processus de sécrétion dans les cellules non neuronales dont l'hypersécrétion, causée entre autre par une libération excessive de messagers inflammatoires, contribue à des maladies telles que les maladies pulmonaires, l'asthme et le diabète (Buxton et al., 2003; Ravichandran et al., 1996; Sikorra et al., 2020). Par exemple, les protéines SNAP23 étant très abondantes dans les cellules β pancréatiques, jouent un rôle dans l'exocytose accrue des granules d'insuline stimulée par la sécrétion du glucose. Dans ce contexte, l'antagonisme de la protéine SNAP23 (par exemple par le biais de son clivage par les BoNT) est l'une des stratégies plausibles pour le traitement du diabète (Liang et al., 2020). Cependant, des études ont révélé que la protéine SNAP23 chez l'Homme était résistante à la BoNT/A. Des mutations au niveau de la chaîne légère de la BoNT/A ont néanmoins permis d'augmenter l'affinité de la BoNT avec la SNAP23 et son clivage.

Bien que les BoNT soient considérées comme les toxines les plus puissantes connues, l'expansion accrue de la compréhension de leur mécanisme d'action a permis de développer des molécules dont la puissance augmente ou dont l'activité et la spécificité sont modifiées pour répondre à des besoins médicaux spécifiques et à un éventail plus large d'options thérapeutiques. Dans ce contexte, l'ensemble du travail réalisé pendant ce doctorat représente une étape importante pour de tels développements

CONCLUSION



L'accès aux cellules souches pluripotentes humaines et aux technologies associées offre maintenant la possibilité de produire des modèles multicellulaires cliniquement et biologiquement pertinents pour l'étude des neurotoxines botuliques. Les autres modèles cellulaires disponibles jusqu'à très récemment pour la détection et les études mécanistiques de ces neurotoxines, ne permettent pas d'examiner la fonction des neurotoxines avec simultanément une pertinence physiologique, une sensibilité et une spécificité d'espèce satisfaisante. Mes travaux confirment l'intérêt que les chercheurs, étudiant les toxines botuliques, portent aux technologies associées aux cellules souches pluripotentes humaines. Je suis convaincue que la combinaison de ces technologies des cellules souches pluripotentes induites humaines et celles de l'automatisation et de la miniaturisation des tests cellulaires permettra à brève échéance de fournir des informations sur de multiples paramètres fonctionnels, essentielles à l'étude de neurotoxines botuliques naturelles comme d'un grand nombre de variants modifiés à dessein thérapeutique dans un contexte humanisé pertinent.

Merci pour le temps que vous avez consacré à la lecture de ce manuscrit.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilić, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., et al. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* *26*, 1276–1284.

Adler, S., Bicker, G., Bigalke, H., Bishop, C., Blümel, J., Dressler, D., Fitzgerald, J., Gessler, F., Heuschen, H., Kegel, B., et al. (2010). The Current Scientific and Legal Status of Alternative Methods to the LD50 Test for Botulinum Neurotoxin Potency Testing: The Report and Recommendations of a Zebet Expert Meeting. *Altern. Lab. Anim.* *38*, 315–330.

Afshar Bakooshli, M., Lippmann, E.S., Mulcahy, B., Iyer, N., Nguyen, C.T., Tung, K., Stewart, B.A., van den Dorpel, H., Fuehrmann, T., Shoichet, M., et al. (2019). A 3D culture model of innervated human skeletal muscle enables studies of the adult neuromuscular junction. *ELife* *8*.

Agirman, G., Broix, L., and Nguyen, L. (2017). Cerebral cortex development: an outside-in perspective. *FEBS Lett.* *591*, 3978–3992.

Akerboom, J., Chen, T.-W., Wardill, T.J., Tian, L., Marvin, J.S., Mutlu, S., Calderon, N.C., Esposti, F., Borghuis, B.G., Sun, X.R., et al. (2012). Optimization of a GCaMP Calcium Indicator for Neural Activity Imaging. *J. Neurosci.* *32*, 13819–13840.

Akerboom, J., Carreras Calderón, N., Tian, L., Wabnig, S., Prigge, M., Tolö, J., Gordus, A., Orger, M.B., Severi, K.E., Macklin, J.J., et al. (2013). Genetically encoded calcium indicators for multi-color neural activity imaging and combination with optogenetics. *Front. Mol. Neurosci.* *6*.

Al-Ghamdi, A.S., Alghanemy, N., Joharji, H., Al-Qahtani, D., and Alghamdi, H. (2015). Botulinum toxin: Non cosmetic and off-label dermatological uses. *J. Dermatol. Dermatol. Surg.* *19*, 1–8.

Ambrosi, C.M., and Entcheva, E. (2014). Optogenetic Control of Cardiomyocytes via Viral Delivery. In *Cardiac Tissue Engineering*, M. Radisic, and L.D. Black III, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 215–228.

van den Aamele, J., Tiberi, L., Vanderhaeghen, P., and Espuny-Camacho, I. (2014). Thinking out of the dish: what to learn about cortical development using pluripotent stem cells. *Trends Neurosci.* *37*, 334–342.

Anastasaki, C., Wegscheid, M.L., Hartigan, K., Papke, J.B., Kopp, N.D., Chen, J., Cobb, O., Dougherty, J.D., and Gutmann, D.H. (2020). Human iPSC-Derived Neurons and Cerebral Organoids Establish Differential Effects of Germline NF1 Gene Mutations. *Stem Cell Rep.* *14*, 541–550.

Angaut-Petit, D., Molgó, J., Comella, J.X., Faille, L., and Tabti, N. (1990). Terminal sprouting in mouse neuromuscular junctions poisoned with botulinum type a toxin: Morphological and electrophysiological features. *Neuroscience* *37*, 799–808.

- Ängeby Möller, K., Svärd, H., Suominen, A., Immonen, J., Holappa, J., and Stenfors, C. (2018). Gait analysis and weight bearing in pre-clinical joint pain research. *J. Neurosci. Methods* *300*, 92–102.
- Antony-Debré, I., Hamidi, S., Norol, F., Vainchenker, W., and Raslova, H. (2013). Induced pluripotent stem cells : from history to applications. *Hématologie* *19*, 20–32.
- Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Mouse Liver and Stomach Cells. *Science* *321*, 699–702.
- Aoki, K.R. (1999). Preclinical update on BOTOX® (botulinum toxin type A)-purified neurotoxin complex relative to other botulinurn neurotoxin preparations. *Eur. J. Neurol.* *6*, s3–s10.
- Aoki, K.R., and Francis, J. (2011). Updates on the antinociceptive mechanism hypothesis of botulinum toxin A. *Parkinsonism Relat. Disord.* *17*, S28–S33.
- Aoki, K.R., and Guyer, B. (2001). Botulinum toxin type A and other botulinum toxin serotypes: a comparative review of biochemical and pharmacological actions. *Eur. J. Neurol.* *8*, 21–29.
- Araki, R., Hoki, Y., Uda, M., Nakamura, M., Jincho, Y., Tamura, C., Sunayama, M., Ando, S., Sugiura, M., Yoshida, M.A., et al. (2011). Crucial Role of c-Myc in the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *STEM CELLS N/A-N/A*.
- Armstrong, R.B., and Phelps, R.O. (1984). Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am. J. Anat.* *171*, 259–272.
- Artamonov, D.N., Korzhova, V.V., Vlasova, O.L., and Bezprozvannyi, I.B. (2014). Optogenetic Approach to the Studies of Synaptic Transmission. *Bull. Exp. Biol. Med.* *157*, 404–407.
- Ashwell, K.W. (2009). Development of the Spinal Cord. In *The Spinal Cord*, (Elsevier), pp. 8–16.
- Aubry, L., Bugi, A., Lefort, N., Rousseau, F., Peschanski, M., and Perrier, A.L. (2008). Striatal progenitors derived from human ES cells mature into DARPP32 neurons in vitro and in quinolinic acid-lesioned rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 16707–16712.
- Aurora, S.K., Winner, P., Freeman, M.C., Spierings, E.L., Heiring, J.O., DeGryse, R.E., VanDenburgh, A.M., Nolan, M.E., and Turkel, C.C. (2011). OnabotulinumtoxinA for Treatment of Chronic Migraine: Pooled Analyses of the 56-Week PREEMPT Clinical Program. *Headache J. Head Face Pain* *51*, 1358–1373.
- Avilion, A.A. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* *17*, 126–140.
- Avior, Y., Sagi, I., and Benvenisty, N. (2016). Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 170–182.

B

- Backman, M., Machon, O., Mygland, L., van den Bout, C.J., Zhong, W., Taketo, M.M., and Krauss, S. (2005). Effects of canonical Wnt signaling on dorso-ventral specification of the mouse telencephalon. *Dev. Biol.* *279*, 155–168.
- Baker, A., Kalmbach, B., Morishima, M., Kim, J., Juavinett, A., Li, N., and Dembrow, N. (2018). Specialized Subpopulations of Deep-Layer Pyramidal Neurons in the Neocortex: Bridging Cellular Properties to Functional Consequences. *J. Neurosci.* *38*, 5441–5455.
- Baker, D.E.C., Harrison, N.J., Maltby, E., Smith, K., Moore, H.D., Shaw, P.J., Heath, P.R., Holden, H., and Andrews, P.W. (2007). Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nat. Biotechnol.* *25*, 207–215.
- Balice-Gordon, R.J. (1996). Schwann cells: Dynamic roles at the neuromuscular junction. *Curr. Biol.* *6*, 1054–1056.
- Barbeau, S., Tahraoui-Bories, J., Legay, C., and Martinat, C. (2020). Building neuromuscular junctions *in vitro*. *Development* *147*, dev193920.
- Basavanna, U., Muruvanda, T., Brown, E.W., and Sharma, S.K. (2013). Development of a Cell-Based Functional Assay for the Detection of *Clostridium botulinum* Neurotoxin Types A and E. *Int. J. Microbiol.* *2013*, 1–7.
- Bassez, G., Audureau, E., Hogrel, J.-Y., Arrouasse, R., Baghdoyan, S., Bhugaloo, H., Gourlay-Chu, M.-L., Le Corvoisier, P., and Peschanski, M. (2018). Improved mobility with metformin in patients with myotonic dystrophy type 1: a randomized controlled trial. *Brain* *141*, 2855–2865.
- Beaulieu, C. (1993). Numerical data on neocortical neurons in adult rat, with special reference to the GABA population. *Brain Res.* *609*, 284–292.
- Bellingham, M.C. (2011). A Review of the Neural Mechanisms of Action and Clinical Efficiency of Riluzole in Treating Amyotrophic Lateral Sclerosis: What have we Learned in the Last Decade?: Neural Mechanisms of Action and Clinical Efficiency of Riluzole in Treating ALS. *CNS Neurosci. Ther.* *17*, 4–31.
- Ben Jehuda, R., Shemer, Y., and Binah, O. (2018). Genome Editing in Induced Pluripotent Stem Cells using CRISPR/Cas9. *Stem Cell Rev. Rep.* *14*, 323–336.
- Benchoua, A., Perrier, A., and Aubry, L. (2008). Method and medium for neural differentiation of pluripotent cells.
- Bengtson, I.A. (1922). Preliminary Note on a Toxin-Producing Anaerobe Isolated from the Larvæ of *Lucilia Cæsar*. *Public Health Rep.* 1896-1970 *37*, 164.
- Bentzinger, C.F., Romanino, K., Cloëtta, D., Lin, S., Mascarenhas, J.B., Oliveri, F., Xia, J., Casanova, E., Costa, C.F., Brink, M., et al. (2008). Skeletal Muscle-Specific Ablation of raptor, but Not of rictor, Causes Metabolic Changes and Results in Muscle Dystrophy. *Cell Metab.* *8*, 411–424.

- Bianchi, F., Malboubi, M., Li, Y., George, J.H., Jerusalem, A., Szele, F., Thompson, M.S., and Ye, H. (2018). Rapid and efficient differentiation of functional motor neurons from human iPSC for neural injury modelling. *Stem Cell Res.* *32*, 126–134.
- Bigalke, H., and Rummel, A. (2015). Botulinum Neurotoxins: Qualitative and Quantitative Analysis Using the Mouse Phrenic Nerve Hemidiaphragm Assay (MPN). *Toxins* *7*, 4895–4905.
- Binz, T., Blasi, J., Yamasaki, S., Baumeister, A., Link, E., Südhof, T.C., Jahn, R., and Niemann, H. (1994). Proteolysis of SNAP-25 by types E and A botulinum neurotoxins. *J. Biol. Chem.* *269*, 1617–1620.
- Blasi, J., Chapman, E.R., Yamasaki, S., Binz, T., Niemann, H., and Jahn, R. (1993). Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *EMBO J.* *12*, 4821–4828.
- Blitzer, A., and Binder, W.J. (2002). Cosmetic Uses of Botulinum Neurotoxin Type A: An Overview. *Arch. Facial Plast. Surg.* *4*, 214–220.
- Blum, R., Petersen, O.H., and Verkhratsky, A. (2010). Ca²⁺ Imaging of Intracellular Organelles: Endoplasmic Reticulum. In *Calcium Measurement Methods*, A. Verkhratsky, and O.H. Petersen, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 147–167.
- Boissart, C., Poulet, A., Georges, P., Darville, H., Julita, E., Delorme, R., Bourgeron, T., Peschanski, M., and Benchoua, A. (2013). Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening. *Transl. Psychiatry* *3*, e294.
- Boncompagni, S. (2012). Severe muscle atrophy due to spinal cord injury can be reversed in complete absence of peripheral nerves. *Eur. J. Transl. Myol.* *22*, 161.
- Bone, H.K., Nelson, A.S., Goldring, C.E., Tosh, D., and Welham, M.J. (2011). A novel chemically directed route for the generation of definitive endoderm from human embryonic stem cells based on inhibition of GSK-3. *J. Cell Sci.* *124*, 1992–2000.
- Bonnans, C., Chou, J., and Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 786–801.
- Borghuis, B.G., Tian, L., Xu, Y., Nikonov, S.S., Vardi, N., Zemelman, B.V., and Looger, L.L. (2011). Imaging Light Responses of Targeted Neuron Populations in the Rodent Retina. *J. Neurosci.* *31*, 2855–2867.
- Borooah, S., Phillips, M.J., Bilican, B., Wright, A.F., Wilmot, I., Chandran, S., Gamm, D., and Dhillon, B. (2013). Using human induced pluripotent stem cells to treat retinal disease. *Prog. Retin. Eye Res.* *37*, 163–181.
- Bose, A., and Beal, M.F. (2019). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in induced pluripotent stem cell models of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* *49*, 525–532.
- Boyd, R.S., Duggan, M.J., Shone, C.C., and Foster, K.A. (1995). The Effect of Botulinum Neurotoxins on the Release of Insulin from the Insulinoma Cell Lines HIT-15 and RINm5F. *J. Biol. Chem.* *270*, 18216–18218.

- Boyden, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., and Deisseroth, K. (2005). Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* *8*, 1263–1268.
- Boyer, A.E., Moura, H., Woolfitt, A.R., Kalb, S.R., McWilliams, L.G., Pavlopoulos, A., Schmidt, J.G., Ashley, D.L., and Barr, J.R. (2005). From the Mouse to the Mass Spectrometer: Detection and Differentiation of the Endoprotease Activities of Botulinum Neurotoxins A–G by Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* *77*, 3916–3924.
- Bozzi, Y., Costantin, L., Antonucci, F., and Caleo, M. (2006). Action of botulinum neurotoxins in the central nervous system: Antiepileptic effects. *Neurotox. Res.* *9*, 197–203.
- Brennand, K.J., Simone, A., Jou, J., Gelboin-Burkhart, C., Tran, N., Sangar, S., Li, Y., Mu, Y., Chen, G., Yu, D., et al. (2011). Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* *473*, 221–225.
- Briggs, R., and King, T.J. (1952). Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *38*, 455–463.
- Brin, M.F., Jankovic, J., Hallett, M. (2002). *Scientific and therapeutic aspects of botulinum toxic* (Philadelphia: Lippincott William & Wilkins).
- Broide, R.S., Rubino, J., Nicholson, G.S., Ardila, M.C., Brown, M.S., Aoki, K.R., and Francis, J. (2013). The rat Digit Abduction Score (DAS) assay: A physiological model for assessing botulinum neurotoxin-induced skeletal muscle paralysis. *Toxicon* *71*, 18–24.
- Bub, G., and Daniels, M.J. (2020). Feasibility of Using Adjunctive Optogenetic Technologies in Cardiomyocyte Phenotyping – from the Single Cell to the Whole Heart. *Curr. Pharm. Biotechnol.* *21*, 752–764.
- Buckingham, M., Bajard, L., Chang, T., Daubas, P., Hadchouel, J., Meilhac, S., Montarras, D., Rocancourt, D., and Relaix, F. (2003). The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *J. Anat.* *202*, 59–68.
- Buganim, Y., Faddah, D.A., Cheng, A.W., Itskovich, E., Markoulaki, S., Ganz, K., Klemm, S.L., van Oudenaarden, A., and Jaenisch, R. (2012). Single-Cell Expression Analyses during Cellular Reprogramming Reveal an Early Stochastic and a Late Hierarchic Phase. *Cell* *150*, 1209–1222.
- Burgen, A.S.V., Dickens, F., and Zatman, L.J. (1949). The action of botulinum toxin on the neuromuscular junction. *J. Physiol.* *109*, 10–24.
- Burke, G.S. (1919). Notes on Bacillus Botulinus. *J. Bacteriol.* *4*, 555-570.1.
- Burkhardt, M.F., Martinez, F.J., Wright, S., Ramos, C., Volfson, D., Mason, M., Garnes, J., Dang, V., Lievers, J., Shoukat-Mumtaz, U., et al. (2013). A cellular model for sporadic ALS using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Mol. Cell. Neurosci.* *56*, 355–364.
- Burstein, R., Zhang, X., Levy, D., Aoki, K.R., and Brin, M.F. (2014). Selective inhibition of meningeal nociceptors by botulinum neurotoxin type A: Therapeutic implications for migraine and other pains. *Cephalalgia* *34*, 853–869.

Buxton, P., Zhang, X.-M., Walsh, B., Sriratana, A., Schenberg, I., Manickam, E., and Rowe, T. (2003). Identification and characterization of Snapin as a ubiquitously expressed SNARE-binding protein that interacts with SNAP23 in non-neuronal cells. *Biochem. J.* *375*, 433–440.

Byers, B., Lee, H., and Reijo Pera, R. (2012). Modeling Parkinson's Disease Using Induced Pluripotent Stem Cells. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* *12*, 237–242.

C

Caleo, M., and Restani, L. (2018). Exploiting Botulinum Neurotoxins for the Study of Brain Physiology and Pathology. *Toxins* *10*, 175.

Cameron, M., Kékesi, O., Morley, J.W., Tapson, J., Breen, P.P., van Schaik, A., and Buskila, Y. (2016). Calcium Imaging of AM Dyes Following Prolonged Incubation in Acute Neuronal Tissue. *PLOS ONE* *11*, e0155468.

Cao, S.-Y., Hu, Y., Chen, C., Yuan, F., Xu, M., Li, Q., Fang, K.-H., Chen, Y., and Liu, Y. (2017). Enhanced derivation of human pluripotent stem cell-derived cortical glutamatergic neurons by a small molecule. *Sci. Rep.* *7*.

Cardozo, M.J., Mysiak, K.S., Becker, T., and Becker, C.G. (2017). Reduce, reuse, recycle – Developmental signals in spinal cord regeneration. *Dev. Biol.* *432*, 53–62.

Caron, L., Kher, D., Lee, K.L., McKernan, R., Dumevska, B., Hidalgo, A., Li, J., Yang, H., Main, H., Ferri, G., et al. (2016). A Human Pluripotent Stem Cell Model of Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy-Affected Skeletal Muscles. *STEM CELLS Transl. Med.* *5*, 1145–1161.

Carruthers, J.D.A., and Carruthers, J.A. (1992). Treatment of Glabellar Frown Lines with C. Botulinum-A Exotoxin. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* *18*, 17–21.

Castellanos-Montiel, M.J., Velasco, I., and Escobedo-Avila, I. (2020). Modeling the neuromuscular junction *in vitro*: an approach to study neuromuscular junction disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*

del Castillo, J., and Katz, B. (1954). The effect of magnesium on the activity of motor nerve endings. *J. Physiol.* *124*, 553–559.

del Castillo, J., and Katz, B. (1955). Local activity at a depolarized nerve-muscle junction. *J. Physiol.* *128*, 396–411.

Cavaleri, F., and Schöler, H.R. (2003). Nanog. *Cell* *113*, 551–552.

Cela, E., and Sjöström, P.J. (2019). Novel Optogenetic Approaches in Epilepsy Research. *Front. Neurosci.* *13*.

Chal, J., and Pourquié, O. (2017). Making muscle: skeletal myogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Development* *144*, 2104–2122.

Chal, J., Oginuma, M., Al Tanoury, Z., Gobert, B., Sumara, O., Hick, A., Bousson, F., Zidouni, Y., Mursch, C., Moncuquet, P., et al. (2015). Differentiation of pluripotent stem cells to muscle fiber to model Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Biotechnol.* *33*, 962–969.

Chaléat-Valayer, E., Bernard, J.-C., and Morel, É. (2005). Injections de toxine botulique chez l'enfant IMC : stratégie multisites, évaluation multidimensionnelle, prises en charge associées. In *La marche de l'infirmes moteur cérébral enfant et adulte*, (Paris: Springer-Verlag), pp. 71–88.

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

Chancellor, M.B., and Smith, C.P. (2011). *Botulinum toxin in urology* (Heidelberg ; New York: Springer).

Chapotte-Baldacci, C.-A., Lizot, G., Jajkiewicz, C., Lévêque, M., Penna, A., Magaud, C., Thoreau, V., Bois, P., Sebille, S., and Chatelier, A. (2020). Fine tuning of calcium constitutive entry by optogenetically-controlled membrane polarization: impact on cell migration (Cell Biology).

Charbord, J., Poydenot, P., Bonnefond, C., Feyeux, M., Casagrande, F., Brinon, B., Francelle, L., Aurégan, G., Guillermier, M., Cailleret, M., et al. (2013). High throughput screening for inhibitors of REST in neural derivatives of human embryonic stem cells reveals a chemical compound that promotes expression of neuronal genes: HTS for REST Inhibitors in Human NSCs. *STEM CELLS* *31*, 1816–1828.

Charrasse, S., Causeret, M., Comunale, F., Bonet-Kerrache, A., and Gauthier-Rouvière, C. (2003). Rho GTPases and cadherin-based cell adhesion in skeletal muscle development. *J. Muscle Res. Cell Motil.* *24*, 309–313.

Chazaud, B. (2018). Cellules satellites et cellules souches musculaires. *Cah. Myol.* 11–14.

Chen, T.-W., Wardill, T.J., Sun, Y., Pulver, S.R., Renninger, S.L., Baohan, A., Schreiter, E.R., Kerr, R.A., Orger, M.B., Jayaraman, V., et al. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* *499*, 295–300.

Cheng, L.W., Land, K.M., Tam, C., Brandon, D.L., and Stanker, L.H. (2016). Technologies for Detecting Botulinum Neurotoxins in Biological and Environmental Matrices. In *Significance, Prevention and Control of Food Related Diseases*, H.A. Makun, ed. (InTech), p.

Choi, I.Y., Lim, H., Estrellas, K., Mula, J., Cohen, T.V., Zhang, Y., Donnelly, C.J., Richard, J.-P., Kim, Y.J., Kim, H., et al. (2016). Concordant but Varied Phenotypes among Duchenne Muscular Dystrophy Patient-Specific Myoblasts Derived using a Human iPSC-Based Model. *Cell Rep.* *15*, 2301–2312.

Clements, I.P., Millard, D.C., Nicolini, A.M., Preyer, A.J., Grier, R., Heckerling, A., Blum, R.A., Tyler, P., McSweeney, K.M., Lu, Y.-F., et al. (2016). Optogenetic stimulation of multiwell MEA plates for neural and cardiac applications. S.J. Madsen, V.X.D. Yang, E.D. Jansen, Q. Luo, S.K. Mohanty, and N.V. Thakor, eds. (San Francisco, California, United States), p. 96902C.

Cobb, S.P., Hogg, R.A., Challoner, D.J., Sharpe, R.T., Brett, M.M., Livesey, C.T., and Jones, T.O. (2002). Suspected botulism in dairy cows and its implications for the safety of human food. *Vet. Rec.* *150*, 5–8.

- Colasante, C., Rossetto, O., Morbiato, L., Pirazzini, M., Molgó, J., and Montecucco, C. (2013). Botulinum Neurotoxin Type A is Internalized and Translocated from Small Synaptic Vesicles at the Neuromuscular Junction. *Mol. Neurobiol.* *48*, 120–127.
- Collins, and East (1998). Phylogeny and taxonomy of the food-borne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins. *J. Appl. Microbiol.* *84*, 5–17.
- Comley, J. (2016). The stem cell dilemma.
- Condamine, H. (1980). Le tératocarcinome de la souris: origine et relation avec les cellules embryonnaires précoces. *Reprod. Nutr. Dév.* *20*, 499–522.
- Connors, B.W., and Gutnick, M.J. (1990). Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci.* *13*, 99–104.
- Cooper, G. (2007). Therapeutic uses of botulinum toxin (Totowa, N.J: Humana).
- Corner, M.A., and Crain, S.M. (1965). Spontaneous contractions and bioelectric activity after differentiation in culture of presumptive neuromuscular tissues of the early frog embryo. *Experientia* *21*, 422–424.
- Cornet, S., Périer, C., and Kalinichev, M. (2020a). Optimization of the rat digit abduction score (DAS) assay: Evaluation of botulinum neurotoxin activity in the gastrocnemius lateralis, peronei, and extensor digitorum longus. *Toxicon X* *6*, 100029.
- Cornet, S., Périer, C., Wagner, S., Andriambelason, E., Pouzet, B., and Kalinichev, M. (2020b). The use of the dynamic weight bearing test to assess the effects of acute, intramuscularly administered botulinum neurotoxin type A1 in rats. *Toxicon X* *7*, 100041.
- Corti, S., Nizzardo, M., Simone, C., Falcone, M., Nardini, M., Ronchi, D., Donadoni, C., Salani, S., Riboldi, G., Magri, F., et al. (2012). Genetic Correction of Human Induced Pluripotent Stem Cells from Patients with Spinal Muscular Atrophy. *Sci. Transl. Med.* *4*, 165ra162-165ra162.
- Cossu, G., and Biressi, S. (2005). Satellite cells, myoblasts and other occasional myogenic progenitors: Possible origin, phenotypic features and role in muscle regeneration. *Semin. Cell Dev. Biol.* *16*, 623–631.
- Costa, E.C., Moreira, A.F., de Melo-Diogo, D., Gaspar, V.M., Carvalho, M.P., and Correia, I.J. (2016). 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnol. Adv.* *34*, 1427–1441.
- Costantin, L. (2005). Antiepileptic Effects of Botulinum Neurotoxin E. *J. Neurosci.* *25*, 1943–1951.
- Cotterill, E., Hall, D., Wallace, K., Mundy, W.R., Eglen, S.J., and Shafer, T.J. (2016). Characterization of Early Cortical Neural Network Development in Multiwell Microelectrode Array Plates. *J. Biomol. Screen.* *21*, 510–519.

Couesnon, A., Molgó, J., Connan, C., and Popoff, M.R. (2012). Preferential Entry of Botulinum Neurotoxin A Hc Domain through Intestinal Crypt Cells and Targeting to Cholinergic Neurons of the Mouse Intestine. *PLoS Pathog.* *8*, e1002583.

Court, F.A., Gillingwater, T.H., Melrose, S., Sherman, D.L., Greenshields, K.N., Morton, A.J., Harris, J.B., Willison, H.J., and Ribchester, R.R. (2008). Identity, developmental restriction and reactivity of extralaminar cells capping mammalian neuromuscular junctions. *J. Cell Sci.* *121*, 3901–3911.

Cowan, C.A. (2005). Nuclear Reprogramming of Somatic Cells After Fusion with Human Embryonic Stem Cells. *Science* *309*, 1369–1373.

Crawford, T.Q., and Roelink, H. (2007). The Notch response inhibitor DAPT enhances neuronal differentiation in embryonic stem cell-derived embryoid bodies independently of sonic hedgehog signaling. *Dev. Dyn.* *236*, 886–892.

Csöbönyeiová, M., Polák, Š., and Danišovič, L. (2016). Toxicity testing and drug screening using iPSC-derived hepatocytes, cardiomyocytes, and neural cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* *94*, 687–694.

D

Dale, H.H., Feldberg, W., and Vogt, M. (1936). Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. *J. Physiol.* *86*, 353–380.

Damdindorj, L., Karnan, S., Ota, A., Hossain, E., Konishi, Y., Hosokawa, Y., and Konishi, H. (2014). A Comparative Analysis of Constitutive Promoters Located in Adeno-Associated Viral Vectors. *PLoS ONE* *9*, e106472.

Darabi, R., Arpke, R.W., Irion, S., Dimos, J.T., Grskovic, M., Kyba, M., and Perlingeiro, R.C.R. (2012). Human ES- and iPS-Derived Myogenic Progenitors Restore DYSTROPHIN and Improve Contractility upon Transplantation in Dystrophic Mice. *Cell Stem Cell* *10*, 610–619.

Darr, H., and Benvenisty, N. (2009). Genetic Analysis of the Role of the Reprogramming Gene *LIN-28* in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* *27*, 352–362.

Davies, J., Liu, S., and Acharya, K. (2018). Variations in the Botulinum Neurotoxin Binding Domain and the Potential for Novel Therapeutics. *Toxins* *10*, 421.

Davis-Dusenbery, B.N., Williams, L.A., Klim, J.R., and Egan, K. (2014). How to make spinal motor neurons. *Development* *141*, 491–501.

Demestre, M., Orth, M., Föhr, K.J., Achberger, K., Ludolph, A.C., Liebau, S., and Boeckers, T.M. (2015). Formation and characterisation of neuromuscular junctions between hiPSC derived motoneurons and myotubes. *Stem Cell Res.* *15*, 328–336.

DeRosa, B.A., El Hokayem, J., Artimovich, E., Garcia-Serje, C., Phillips, A.W., Van Booven, D., Nestor, J.E., Wang, L., Cuccaro, M.L., Vance, J.M., et al. (2018). Convergent Pathways in Idiopathic Autism Revealed by Time Course Transcriptomic Analysis of Patient-Derived Neurons. *Sci. Rep.* *8*.

- Deschenes, M.R., Covault, J., Kraemer, W.J., and Maresh, C.M. (1994a). The Neuromuscular Junction: Muscle Fibre Type Differences, Plasticity and Adaptability to Increased and Decreased Activity. *Sports Med.* *17*, 358–372.
- Deschenes, M.R., Maresh, C.M., and Kraemer, William J. (1994b). The Neuromuscular Junction: Structure, Function, and its Role in the Excitation of Muscle. *J. Strength Cond. Res.* 103–109.
- Dessaud, E., McMahon, A.P., and Briscoe, J. (2008). Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. *Development* *135*, 2489–2503.
- Devine, H., and Patani, R. (2017). The translational potential of human induced pluripotent stem cells for clinical neurology: The translational potential of hiPSCs in neurology. *Cell Biol. Toxicol.* *33*, 129–144.
- Dietrich, S., Abou-Rebyeh, F., Brohmann, H., Blatt, F., Sonnenberg-Riethmacher, E., Yamaai, T., Lumsden, A., Brand-Saberi, B., and Birchmeier, C. (1999). The role of SF/HGF and c-Met in the development of skeletal muscle. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 1621–1629.
- Dimos, J.T., Rodolfa, K.T., Niakan, K.K., Weisenthal, L.M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G.F., Saphier, G., Leibel, R., Goland, R., et al. (2008). Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Patients with ALS Can Be Differentiated into Motor Neurons. *Science* *321*, 1218–1221.
- Ding, J., Luo, A.F., Hu, L., Wang, D., and Shao, F. (2014). Structural basis of the ultrasensitive calcium indicator GCaMP6. *Sci. China Life Sci.* *57*, 269–274.
- Doellgast, G.J., Triscott, M.X., Beard, G.A., Bottoms, J.D., Cheng, T., Roh, B.H., Roman, M.G., Hall, P.A., and Brown, J.E. (1993). Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Clostridium botulinum neurotoxins A, B, and E using signal amplification via enzyme-linked coagulation assay. *J. Clin. Microbiol.* *31*, 2402–2409.
- Dolly, J.O., Wang, J., Zurawski, T.H., and Meng, J. (2011). Novel therapeutics based on recombinant botulinum neurotoxins to normalize the release of transmitters and pain mediators: A versatile inhibitor of exocytosis. *FEBS J.* *278*, 4454–4466.
- Donald, S., Elliott, M., Gray, B., Hornby, F., Lewandowska, A., Marlin, S., Favre-Guilmard, C., Périer, C., Cornet, S., Kalinichev, M., et al. (2018). A comparison of biological activity of commercially available purified native botulinum neurotoxin serotypes A1 to F1 in vitro, ex vivo, and in vivo. *Pharmacol. Res. Perspect.* *6*, e00446.
- Dong, M. (2006). SV2 Is the Protein Receptor for Botulinum Neurotoxin A. *Science* *312*, 592–596.
- Dong, M., and Stenmark, P. (2019). The Structure and Classification of Botulinum Toxins. In *Botulinum Toxin Therapy*, S.M. Whitcup, and M. Hallett, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 11–33.
- Dong, M., Richards, D.A., Goodnough, M.C., Tepp, W.H., Johnson, E.A., and Chapman, E.R. (2003). Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J. Cell Biol.* *162*, 1293–1303.

- Dong, M., Tepp, W.H., Liu, H., Johnson, E.A., and Chapman, E.R. (2007). Mechanism of botulinum neurotoxin B and G entry into hippocampal neurons. *J. Cell Biol.* *179*, 1511–1522.
- Dong, M., Liu, H., Tepp, W.H., Johnson, E.A., Janz, R., and Chapman, E.R. (2008). Glycosylated SV2A and SV2B Mediate the Entry of Botulinum Neurotoxin E into Neurons. *Mol. Biol. Cell* *19*, 5226–5237.
- Dong, M., Masuyer, G., and Stenmark, P. (2019). Botulinum and Tetanus Neurotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* *88*, 811–837.
- Dorizas, A., Krueger, N., and Sadick, N.S. (2014). Aesthetic Uses of the Botulinum Toxin. *Dermatol. Clin.* *32*, 23–36.
- Dorner, M.B., Schulz, K.M., Kull, S., and Dorner, B.G. (2012). Complexity of Botulinum Neurotoxins: Challenges for Detection Technology. In *Botulinum Neurotoxins*, A. Rummel, and T. Binz, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 219–255.
- Douglas, R.J., and Martin, K.A.C. (2004). NEURONAL CIRCUITS OF THE NEOCORTEX. *Annu. Rev. Neurosci.* *27*, 419–451.
- Dressler, D. (2017). *Toxine botulique thérapeutique: Guide d'utilisation*.
- Dressler, D., and Adib Saberi, F. (2005). Botulinum Toxin: Mechanisms of Action. *Eur. Neurol.* *53*, 3–9.
- Dressler, D., and Benecke, R. (2007). Pharmacology of therapeutic botulinum toxin preparations. *Disabil. Rehabil.* *29*, 1761–1768.
- Dressler, D., Lange, M., and Bigalke, H. (2005). Mouse diaphragm assay for detection of antibodies against botulinum toxin type B. *Mov. Disord.* *20*, 1617–1619.
- Du, Z.-W., Chen, H., Liu, H., Lu, J., Qian, K., Huang, C.-L., Zhong, X., Fan, F., and Zhang, S.-C. (2015). Generation and expansion of highly pure motor neuron progenitors from human pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* *6*.
- Duchesne de Lamotte, J., Roqueviere, S., Gautier, H., Raban, E., Bouré, C., Fonfria, E., Krupp, J., and Nicoleau, C. (2021). hiPSC-Derived Neurons Provide a Robust and Physiologically Relevant In Vitro Platform to Test Botulinum Neurotoxins. *Front. Pharmacol.* *11*.
- Duman, J.G., and Forte, J.G. (2003). What is the role of SNARE proteins in membrane fusion? *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* *285*, C237–C249.
- Dunning, F.M., Piazza, T.M., Zeytin, F.N., and Tucker, W.C. (2014). Isolation and quantification of botulinum neurotoxin from complex matrices using the BoTest matrix assays. *J. Vis. Exp. JoVE*.
- Durstun, A.J., Timmermans, J.P.M., Hage, W.J., Hendriks, H.F.J., de Vries, N.J., Heideveld, M., and Nieuwkoop, P.D. (1989). Retinoic acid causes an anteroposterior transformation in the developing central nervous system. *Nature* *340*, 140–144.

E

- Ebert, A.D., Yu, J., Rose, F.F., Mattis, V.B., Lorson, C.L., Thomson, J.A., and Svendsen, C.N. (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* *457*, 277–280.
- Ebert, A.D., Liang, P., and Wu, J.C. (2012). Induced Pluripotent Stem Cells as a Disease Modeling and Drug Screening Platform: *J. Cardiovasc. Pharmacol.* *60*, 408–416.
- Eichler, M., Jahnke, H.-G., Krinke, D., Müller, A., Schmidt, S., Azendorf, R., and Robitzki, A.A. (2015). A novel 96-well multielectrode array based impedimetric monitoring platform for comparative drug efficacy analysis on 2D and 3D brain tumor cultures. *Biosens. Bioelectron.* *67*, 582–589.
- Eiraku, M., Watanabe, K., Matsuo-Takasaki, M., Kawada, M., Yonemura, S., Matsumura, M., Wataya, T., Nishiyama, A., Muguruma, K., and Sasai, Y. (2008). Self-Organized Formation of Polarized Cortical Tissues from ESCs and Its Active Manipulation by Extrinsic Signals. *Cell Stem Cell* *3*, 519–532.
- El Far, O., and Seagar, M. (2011). SNARE, V-ATPase et neurotransmission. *Médecine/Sciences* *27*, 28–31.
- Eleopra, R., Rinaldo, S., Montecucco, C., Rossetto, O., and Devigili, G. (2020). Clinical duration of action of different botulinum toxin types in humans. *Toxicon* *179*, 84–91.
- Elkabetz, Y., Panagiotakos, G., Al Shamy, G., Socci, N.D., Tabar, V., and Studer, L. (2008). Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes Dev.* *22*, 152–165.
- Elliott, M., Favre-Guilmard, C., Liu, S.M., Maignel, J., Masuyer, G., Beard, M., Boone, C., Carré, D., Kalinichev, M., Lezmi, S., et al. (2019). Engineered botulinum neurotoxin B with improved binding to human receptors has enhanced efficacy in preclinical models. *Sci. Adv.* *5*, eaau7196.
- Eminli, S., Utikal, J., Arnold, K., Jaenisch, R., and Hochedlinger, K. (2008). Reprogramming of Neural Progenitor Cells into Induced Pluripotent Stem Cells in the Absence of Exogenous Sox2 Expression: REPROGRAMMING OF NEURAL PROGENITOR CELLS INTO INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS IN THE ABSENCE OF EXOGENOUS SOX2 EXPRESSION. *STEM CELLS* *26*, 2467–2474.
- Eminli, S., Foudi, A., Stadtfeld, M., Maherali, N., Ahfeldt, T., Mostoslavsky, G., Hock, H., and Hochedlinger, K. (2009). Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat. Genet.* *41*, 968–976.
- Engle, S.J., and Puppala, D. (2013). Integrating Human Pluripotent Stem Cells into Drug Development. *Cell Stem Cell* *12*, 669–677.
- Erbguth, F.J. (1998). Botulinum toxin, a historical note. *The Lancet* *351*, 1820.
- Erbguth, F.J. (2004). Historical notes on botulism, *Clostridium botulinum*, botulinum toxin, and the idea of the therapeutic use of the toxin. *Mov. Disord.* *19*, S2–S6.
- Erbguth, F.J. (2008). From poison to remedy: the chequered history of botulinum toxin. *J. Neural Transm.* *115*, 559–565.

Erecinska, M. (1990). Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* *35*, 245–296.

Ermengem, E. van (1897). Ueber einen neuen anaeroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus (Z Hyg Infektionskrankh).

Escargueil, C.R., Machado, C.B., Blanc, R.P., Fleck, R.A., and Sesardic, D. (2011). Enhanced sensitivity to Botulinum type A neurotoxin of human neuroblastoma SH-SY5Y cells after differentiation into mature neuronal cells. *Botulinum J* *2*, 30.

Escher, C.M., Paracka, L., Dressler, D., and Kollwe, K. (2017). Botulinum toxin in the management of chronic migraine: clinical evidence and experience. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* *10*, 127–135.

Espuny-Camacho, I., Michelsen, K.A., Gall, D., Linaro, D., Hasche, A., Bonnefont, J., Bali, C., Orduz, D., Bilheu, A., Herpoel, A., et al. (2013). Pyramidal Neurons Derived from Human Pluripotent Stem Cells Integrate Efficiently into Mouse Brain Circuits In Vivo. *Neuron* *77*, 440–456.

Espuny-Camacho, I., Arranz, A.M., Fiers, M., Snellinx, A., Ando, K., Munck, S., Bonnefont, J., Lambot, L., Corthout, N., Omodho, L., et al. (2017). Hallmarks of Alzheimer's Disease in Stem-Cell-Derived Human Neurons Transplanted into Mouse Brain. *Neuron* *93*, 1066-1081.e8.

Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* *292*, 154–156.

F

Fedorova, V., Vanova, T., Elrefae, L., Pospisil, J., Petrasova, M., Kolajova, V., Hudacova, Z., Baniariova, J., Barak, M., Peskova, L., et al. (2019). Differentiation of neural rosettes from human pluripotent stem cells in vitro is sequentially regulated on a molecular level and accomplished by the mechanism reminiscent of secondary neurulation. *Stem Cell Res.* *40*, 101563.

Fernández-Salas, E., Wang, J., Molina, Y., Nelson, J.B., Jacky, B.P.S., and Aoki, K.R. (2012). Botulinum Neurotoxin Serotype a Specific Cell-Based Potency Assay to Replace the Mouse Bioassay. *PLoS ONE* *7*, e49516.

Ferreira, J.L., Eliasberg, S.J., Edmonds, P., and Harrison, M.A. (2004). Comparison of the Mouse Bioassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Procedures for the Detection of Type A Botulinum Toxin in Food. *J. Food Prot.* *67*, 203–206.

Flight, M.H. (2009). Wnts and motor neuron destiny. *Nat. Rev. Neurosci.* *10*, 316–317.

Fonfria, E. (2018). Botulinum Neurotoxin: A Multifunctional Protein for the Development of New Therapeutics. In *Neurotoxins*, J.E. McDuffie, ed. (InTech), p.

Fonfria, E., Maignel, J., Lezmi, S., Martin, V., Splevins, A., Shubber, S., Kalinichev, M., Foster, K., Picaut, P., and Krupp, J. (2018). The Expanding Therapeutic Utility of Botulinum Neurotoxins. *Toxins* *10*, 208.

Foran, P.G., Mohammed, N., Lisk, G.O., Nagwaney, S., Lawrence, G.W., Johnson, E., Smith, L., Aoki, K.R., and Dolly, J.O. (2003a). Evaluation of the Therapeutic Usefulness of Botulinum Neurotoxin B, C1, E,

and F Compared with the Long Lasting Type A: BASIS FOR DISTINCT DURATIONS OF INHIBITION OF EXOCYTOSIS IN CENTRAL NEURONS. *J. Biol. Chem.* *278*, 1363–1371.

Foran, P.G., Davletov, B., and Meunier, F.A. (2003b). Getting muscles moving again after botulinum toxin: novel therapeutic challenges. *Trends Mol. Med.* *9*, 291–299.

Förster, D., Dal Maschio, M., Laurell, E., and Baier, H. (2017). An optogenetic toolbox for unbiased discovery of functionally connected cells in neural circuits. *Nat. Commun.* *8*.

Foster, K.A. (2014). *Molecular aspects of botulinum neurotoxin* (New York: Springer).

Frevert, J. (2015). Pharmaceutical, Biological, and Clinical Properties of Botulinum Neurotoxin Type A Products. *Drugs RD* *15*, 1–9.

Fulka, J., and Fulka, H. (2007). Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) in Mammals: The Cytoplasm and Its Reprogramming Activities. In *Somatic Cell Nuclear Transfer*, P. Sutovsky, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 93–102.

Funk, A.J., Mielnik, C.A., Koene, R., Newburn, E., Ramsey, A.J., Lipska, B.K., and McCullumsmith, R.E. (2017). Postsynaptic Density-95 Isoform Abnormalities in Schizophrenia. *Schizophr. Bull.* sbw173.

Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., and Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* *85*, 348–362.

G

Gabriel, E., and Gopalakrishnan, J. (2017). Generation of iPSC-derived Human Brain Organoids to Model Early Neurodevelopmental Disorders. *J. Vis. Exp.*

Gaj, T., Gersbach, C.A., and Barbas, C.F. (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* *31*, 397–405.

Galiakberova, A.A., and Dashinimaev, E.B. (2020). Neural Stem Cells and Methods for Their Generation From Induced Pluripotent Stem Cells in vitro. *Front. Cell Dev. Biol.* *8*.

Gardner, A., and Barbieri, J. (2018). Light Chain Diversity among the Botulinum Neurotoxins. *Toxins* *10*, 268.

Garita-Hernandez, M., Guibbal, L., Toulbi, L., Routet, F., Chaffiol, A., Winckler, C., Harinquet, M., Robert, C., Fouquet, S., Bellow, S., et al. (2018). Optogenetic Light Sensors in Human Retinal Organoids. *Front. Neurosci.* *12*.

Gart, M.S., and Gutowski, K.A. (2016). Overview of Botulinum Toxins for Aesthetic Uses. *Clin. Plast. Surg.* *43*, 459–471.

Gaspard, N., Bouschet, T., Hourez, R., Dimidschstein, J., Naeije, G., van den Aemele, J., Espuny-Camacho, I., Herpoel, A., Passante, L., Schiffmann, S.N., et al. (2008). An intrinsic mechanism of corticogenesis from embryonic stem cells. *Nature* *455*, 351–357.

- Gaspard, N., Bouschet, T., Herpoel, A., Naeije, G., van den Aemele, J., and Vanderhaeghen, P. (2009). Generation of cortical neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat. Protoc.* *4*, 1454–1463.
- Gendler, E., and Nagler, A. (2015). Aesthetic use of BoNT: Options and outcomes. *Toxicol.* *107*, 120–128.
- Gesemann, M., Denzer, A.J., and Ruegg, M.A. (1995). Acetylcholine receptor-aggregating activity of agrin isoforms and mapping of the active site. *J. Cell Biol.* *128*, 625–636.
- Gilmore, E.C., and Herrup, K. (1997). Cortical development: Layers of complexity. *Curr. Biol.* *7*, R231–R234.
- Gimenez, D.F., and Ciccarelli, A.S. (1972). [Antigenic variations in F type botulinum toxins. Attempted definitions by serological typing and classification of *Clostridium botulinum*]. *Medicina (Mex.)* *32*, 596–606.
- Giménez, D.F., and Giménez, J.A. (1995). The typing of botulinal neurotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* *27*, 1–9.
- Glickstein, M. (2006). Golgi and Cajal: The neuron doctrine and the 100th anniversary of the 1906 Nobel Prize. *Curr. Biol.* *16*, R147–R151.
- Goncalves, S.B., Ribeiro, J.F., Silva, A.F., Costa, R.M., and Correia, J.H. (2017). Design and manufacturing challenges of optogenetic neural interfaces: a review. *J. Neural Eng.* *14*, 041001.
- González, F., Boué, S., and Belmonte, J.C.I. (2011). Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming à la carte. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 231–242.
- Goulburn, A.L., Alden, D., Davis, R.P., Micallef, S.J., Ng, E.S., Yu, Q.C., Lim, S.M., Soh, C.-L., Elliott, D.A., Hatzistavrou, T., et al. (2011). A Targeted NKX2.1 Human Embryonic Stem Cell Reporter Line Enables Identification of Human Basal Forebrain Derivatives. *STEM CELLS* *29*, 462–473.
- Gribaudo, S., Tixador, P., Bousset, L., Fenyi, A., Lino, P., Melki, R., Peyrin, J.-M., and Perrier, A.L. (2019). Propagation of α -Synuclein Strains within Human Reconstructed Neuronal Network. *Stem Cell Rep.* *12*, 230–244.
- Grienberger, C., and Konnerth, A. (2012). Imaging Calcium in Neurons. *Neuron* *73*, 862–885.
- Grunwald, L.-M., Stock, R., Haag, K., Buckenmaier, S., Eberle, M.-C., Wildgruber, D., Storchak, H., Kriebel, M., Weißgraeber, S., Mathew, L., et al. (2019). Comparative characterization of human induced pluripotent stem cells (hiPSC) derived from patients with schizophrenia and autism. *Transl. Psychiatry* *9*.
- Gu, S., Rumpel, S., Zhou, J., Strotmeier, J., Bigalke, H., Perry, K., Shoemaker, C.B., Rummel, A., and Jin, R. (2012). Botulinum Neurotoxin Is Shielded by NTNHA in an Interlocked Complex. *Science* *335*, 977–981.
- Gunnison, J.B., Cummings, J.R., and Meyer, K.F. (1936). *Clostridium Botulinum* Type E. *Exp. Biol. Med.* *35*, 278–280.

Gupta, R.M., and Musunuru, K. (2014). Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *J. Clin. Invest.* *124*, 4154–4161.

Gurdon, J.B. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exp. Morphol.* *10*, 622–640.

H

Hamark, C., Berntsson, R.P.-A., Masuyer, G., Henriksson, L.M., Gustafsson, R., Stenmark, P., and Widmalm, G. (2017). Glycans Confer Specificity to the Recognition of Ganglioside Receptors by Botulinum Neurotoxin A. *J. Am. Chem. Soc.* *139*, 218–230.

Haoulia, N. (2014). De l'interdiction de la recherche sur l'embryon et les cellules souches au régime d'autorisation sous condition : brèves remarques sur la protection de la vie humaine dans la loi no 2013-715 du 6 août 2013. *Médecine Droit* *2014*, 23–25.

Harper, C.B., Papadopoulos, A., Martin, S., Matthews, D.R., Morgan, G.P., Nguyen, T.H., Wang, T., Nair, D., Choquet, D., and Meunier, F.A. (2016). Botulinum neurotoxin type-A enters a non-recycling pool of synaptic vesicles. *Sci. Rep.* *6*.

Harrison, R.G. (1959). The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. *J. Exp. Zool.* *142*, 5–73.

Hauschild, A.H.W. (2018). *Clostridium botulinum: Ecology and Control in Foods* (Routledge).

Hedegaard, A., Monzón-Sandoval, J., Newey, S.E., Whiteley, E.S., Webber, C., and Akerman, C.J. (2020a). Pro-maturational Effects of Human iPSC-Derived Cortical Astrocytes upon iPSC-Derived Cortical Neurons. *Stem Cell Rep.* *15*, 38–51.

Hedegaard, A., Stodolak, S., James, W.S., and Cowley, S.A. (2020b). Honing the Double-Edged Sword: Improving Human iPSC-Microglia Models. *Front. Immunol.* *11*.

Herz, J., Chen, Y., Masiulis, I., and Zhou, L. (2009). Expanding functions of lipoprotein receptors. *J. Lipid Res.* *50*, S287–S292.

Heuser, J.E., and Salpeter, S.R. (1979). Organization of acetylcholine receptors in quick-frozen, deep-etched, and rotary-replicated Torpedo postsynaptic membrane. *J. Cell Biol.* *82*, 150–173.

Hirschi, K.K., Li, S., and Roy, K. (2014). Induced Pluripotent Stem Cells for Regenerative Medicine. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* *16*, 277–294.

Hobbs, R.J., Thomas, C.A., Halliwell, J., and Gwenin, C.D. (2019). Rapid Detection of Botulinum Neurotoxins—A Review. *Toxins* *11*, 418.

Holland, R.L., and Brown, M.C. (1981). Nerve growth in botulinum toxin poisoned muscles. *Neuroscience* *6*, 1167–1179.

Hollingworth, S., Gee, K.R., and Baylor, S.M. (2009). Low-Affinity Ca²⁺ Indicators Compared in Measurements of Skeletal Muscle Ca²⁺ Transients. *Biophys. J.* *97*, 1864–1872.

Hsu, T.S.J., Dover, J.S., and Arndt, K.A. (2004). Effect of Volume and Concentration on the Diffusion of Botulinum Exotoxin A. *Arch. Dermatol.* *140*.

Hu, B.-Y., and Zhang, S.-C. (2009). Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells. *Nat. Protoc.* *4*, 1295–1304.

Huang, G., Chen, S., Chen, X., Zheng, J., Xu, Z., Doostparast Torshizi, A., Gong, S., Chen, Q., Ma, X., Yu, J., et al. (2019). Uncovering the Functional Link Between SHANK3 Deletions and Deficiency in Neurodevelopment Using iPSC-Derived Human Neurons. *Front. Neuroanat.* *13*.

Huang, X., Liu, J., Ketova, T., Fleming, J.T., Grover, V.K., Cooper, M.K., Litingtung, Y., and Chiang, C. (2010). Transventricular delivery of Sonic hedgehog is essential to cerebellar ventricular zone development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 8422–8427.

Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A.E., and Melton, D.A. (2008). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat. Biotechnol.* *26*, 795–797.

Hyung, S., Yoon Lee, B., Park, J.-C., Kim, J., Hur, E.-M., and Francis Suh, J.-K. (2015). Coculture of Primary Motor Neurons and Schwann Cells as a Model for In Vitro Myelination. *Sci. Rep.* *5*.

Hyvärinen, T., Hyysalo, A., Kapucu, F.E., Aarnos, L., Vinogradov, A., Eglén, S.J., Ylä-Outinen, L., and Narkilahti, S. (2019). Functional characterization of human pluripotent stem cell-derived cortical networks differentiated on laminin-521 substrate: comparison to rat cortical cultures. *Sci. Rep.* *9*.

I

Ideguchi, M., Palmer, T.D., Recht, L.D., and Weimann, J.M. (2010). Murine Embryonic Stem Cell-Derived Pyramidal Neurons Integrate into the Cerebral Cortex and Appropriately Project Axons to Subcortical Targets. *J. Neurosci.* *30*, 894–904.

Iida, S., Shimba, K., Sakai, K., Kotani, K., and Jimbo, Y. (2018). Synchronous firing patterns of induced pluripotent stem cell-derived cortical neurons depend on the network structure consisting of excitatory and inhibitory neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *501*, 152–157.

Ikeda, Y., Zabbarova, I.V., Birder, L.A., de Groat, W.C., McCarthy, C.J., Hanna-Mitchell, A.T., and Kanai, A.J. (2012). Botulinum Neurotoxin Serotype A Suppresses Neurotransmitter Release from Afferent as Well as Efferent Nerves in the Urinary Bladder. *Eur. Urol.* *62*, 1157–1164.

Ilic, D., and Ogilvie, C. (2017). Concise Review: Human Embryonic Stem Cells-What Have We Done? What Are We Doing? Where Are We Going?: hESC: Past, Present and Future. *STEM CELLS* *35*, 17–25.

Ille, F., Atanasoski, S., Falk, S., Ittner, L.M., Märki, D., Büchmann-Møller, S., Wurdak, H., Suter, U., Taketo, M.M., and Sommer, L. (2007). Wnt/BMP signal integration regulates the balance between proliferation and differentiation of neuroepithelial cells in the dorsal spinal cord. *Dev. Biol.* *304*, 394–408.

Itoh, K., Tezuka, H., Sakoda, H., Konno, M., Nagata, K., Uchiyama, T., Uchino, H., and Mori, K.J. (1989). Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow. *Exp. Hematol.* *17*, 145–153.

J

Jabbari, B. (2016). History of Botulinum Toxin Treatment in Movement Disorders. *Tremor Hyperkinetic Mov.* *6*, 394.

Jaenisch, R., and Young, R. (2008). Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Cell* *132*, 567–582.

Jankovic, J., and Brin, M.F. (1997). Botulinum toxin: historical perspective and potential new indications. *Muscle Nerve. Suppl.* *6*, S129-145.

Jarrige, M., Frank, E., Herardot, E., Martineau, S., Darle, A., Benabides, M., Domingues, S., Chose, O., Habeler, W., Lorant, J., et al. (2021). The Future of Regenerative Medicine: Cell Therapy Using Pluripotent Stem Cells and Acellular Therapies Based on Extracellular Vesicles. *Cells* *10*, 240.

Jenkinson, S.P., Grandgirard, D., Heidemann, M., Tschertner, A., Avondet, M.-A., and Leib, S.L. (2017). Embryonic Stem Cell-Derived Neurons Grown on Multi-Electrode Arrays as a Novel In vitro Bioassay for the Detection of Clostridium botulinum Neurotoxins. *Front. Pharmacol.* *8*.

Jia, Z., Valiunas, V., Lu, Z., Bien, H., Liu, H., Wang, H.-Z., Rosati, B., Brink, P.R., Cohen, I.S., and Entcheva, E. (2011). Stimulating Cardiac Muscle by Light: Cardiac Optogenetics by Cell Delivery. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* *4*, 753–760.

Jiwlawat, N., Lynch, E., Jeffrey, J., Van Dyke, J.M., and Suzuki, M. (2018). Current Progress and Challenges for Skeletal Muscle Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells Using Transgene-Free Approaches. *Stem Cells Int.* *2018*, 1–18.

Johnson, E.A. (1999). Clostridial Toxins as Therapeutic Agents: Benefits of Nature's Most Toxic Proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* *53*, 551–575.

Jones, R.A., Harrison, C., Eaton, S.L., Llaverro Hurtado, M., Graham, L.C., Alkhamash, L., Oladiran, O.A., Gale, A., Lamont, D.J., Simpson, H., et al. (2017). Cellular and Molecular Anatomy of the Human Neuromuscular Junction. *Cell Rep.* *21*, 2348–2356.

Julius, D. (2013). TRP Channels and Pain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *29*, 355–384.

Juopperi, T.A., Song, H., and Ming, G. (2011). Modeling neurological diseases using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Future Neurol.* *6*, 363–373.

K

Kadlecová, A., Maková, B., Artal-Sanz, M., Strnad, M., and Voller, J. (2019). The plant hormone kinetin in disease therapy and healthy aging. *Ageing Res. Rev.* *55*, 100958.

- Kalb, S.R., Baudys, J., Raphael, B.H., Dykes, J.K., Lúquez, C., Maslanka, S.E., and Barr, J.R. (2015). Functional Characterization of Botulinum Neurotoxin Serotype H as a Hybrid of Known Serotypes F and A (BoNT F/A). *Anal. Chem.* *87*, 3911–3917.
- Kallur, T., Gisler, R., Lindvall, O., and Kokaia, Z. (2008). Pax6 promotes neurogenesis in human neural stem cells. *Mol. Cell. Neurosci.* *38*, 616–628.
- Kang, W., Wong, L.C., Shi, S.-H., and Hebert, J.M. (2009). The Transition from Radial Glial to Intermediate Progenitor Cell Is Inhibited by FGF Signaling during Corticogenesis. *J. Neurosci.* *29*, 14571–14580.
- Karagiannis, P., Nakauchi, A., and Yamanaka, S. (2018). Bringing Induced Pluripotent Stem Cell Technology to the Bedside. *JMA J.* *1*, 6–14.
- Karumbayaram, S., Novitch, B.G., Patterson, M., Umbach, J.A., Richter, L., Lindgren, A., Conway, A.E., Clark, A.T., Goldman, S.A., Plath, K., et al. (2009). Directed Differentiation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells Generates Active Motor Neurons: Differentiation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells. *STEM CELLS* *27*, 806–811.
- Kawamura, K., Chen, Y., Shu, Y., Cheng, Y., Qiao, J., Behr, B., Pera, R.A.R., and Hsueh, A.J.W. (2012). Promotion of Human Early Embryonic Development and Blastocyst Outgrowth In Vitro Using Autocrine/Paracrine Growth Factors. *PLoS ONE* *7*, e49328.
- Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y., Nakanishi, S., Nishikawa, S.-I., and Sasai, Y. (2000). Induction of Midbrain Dopaminergic Neurons from ES Cells by Stromal Cell-Derived Inducing Activity. *Neuron* *28*, 31–40.
- Keller, J.E., Cai, F., and Neale, E.A. (2004). Uptake of Botulinum Neurotoxin into Cultured Neurons. *Biochemistry* *43*, 526–532.
- Kim, H.-J., Lee, G.-W., Kim, M.-J., Yang, K.-Y., Kim, S.-T., Bae, Y.-C., and Ahn, D.-K. (2015). Antinociceptive Effects of Transcytosed Botulinum Neurotoxin Type A on Trigeminal Nociception in Rats. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* *19*, 349.
- Kim, J., Chu, J., Shen, X., Wang, J., and Orkin, S.H. (2008). An Extended Transcriptional Network for Pluripotency of Embryonic Stem Cells. *Cell* *132*, 1049–1061.
- Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I.R., et al. (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* *467*, 285–290.
- Kiris, E., Nuss, J.E., Burnett, J.C., Kota, K.P., Koh, D.C., Wanner, L.M., Torres-Melendez, E., Gussio, R., Tessarollo, L., and Bavari, S. (2011). Embryonic stem cell-derived motoneurons provide a highly sensitive cell culture model for botulinum neurotoxin studies, with implications for high-throughput drug discovery. *Stem Cell Res.* *6*, 195–205.
- Kiris, E., Kota, K.P., Burnett, J.C., Soloveva, V., Kane, C.D., and Bavari, S. (2014). Recent developments in cell-based assays and stem cell technologies for botulinum neurotoxin research and drug discovery. *Expert Rev. Mol. Diagn.* *14*, 153–168.

- Kirkeby, A., Grealish, S., Wolf, D.A., Nelander, J., Wood, J., Lundblad, M., Lindvall, O., and Parmar, M. (2012). Generation of Regionally Specified Neural Progenitors and Functional Neurons from Human Embryonic Stem Cells under Defined Conditions. *Cell Rep.* *1*, 703–714.
- Kishigami, S., and Wakayama, T. (2009). Somatic Cell Nuclear Transfer in the Mouse. In *Microinjection*, D.J. Carroll, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 207–218.
- Kiskinis, E., and Eggan, K. (2010). Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells. *J. Clin. Invest.* *120*, 51–59.
- Kivell, B.M., McDonald, F.J., and Miller, J.H. (2001). Method for serum-free culture of late fetal and early postnatal rat brainstem neurons. *Brain Res. Protoc.* *6*, 91–99.
- Klapoetke, N.C., Murata, Y., Kim, S.S., Pulver, S.R., Birdsey-Benson, A., Cho, Y.K., Morimoto, T.K., Chuong, A.S., Carpenter, E.J., Tian, Z., et al. (2014). Independent optical excitation of distinct neural populations. *Nat. Methods* *11*, 338–346.
- Klimanskaya, I., Chung, Y., Becker, S., Lu, S.-J., and Lanza, R. (2007). Derivation of human embryonic stem cells from single blastomeres. *Nat. Protoc.* *2*, 1963–1972.
- Koch, P., Opitz, T., Steinbeck, J.A., Ladewig, J., and Brustle, O. (2009). A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 3225–3230.
- Kogut, I., McCarthy, S.M., Pavlova, M., Astling, D.P., Chen, X., Jakimenko, A., Jones, K.L., Getahun, A., Cambier, J.C., Pasmooij, A.M.G., et al. (2018). High-efficiency RNA-based reprogramming of human primary fibroblasts. *Nat. Commun.* *9*.
- Komada, M., Saitsu, H., Kinboshi, M., Miura, T., Shiota, K., and Ishibashi, M. (2008). Hedgehog signaling is involved in development of the neocortex. *Development* *135*, 2717–2727.
- Kroken, A.R., Blum, F.C., Zuverink, M., and Barbieri, J.T. (2017). Entry of Botulinum Neurotoxin Subtypes A1 and A2 into Neurons. *Infect. Immun.* *85*.
- Kügler, S., Kilic, E., and Bähr, M. (2003). Human synapsin 1 gene promoter confers highly neuron-specific long-term transgene expression from an adenoviral vector in the adult rat brain depending on the transduced area. *Gene Ther.* *10*, 337–347.
- Kuijlaars, J., Oyelami, T., Diels, A., Rohrbacher, J., Versweyveld, S., Meneghello, G., Tuefferd, M., Verstraelen, P., Detrez, J.R., Verschuuren, M., et al. (2016). Sustained synchronized neuronal network activity in a human astrocyte co-culture system. *Sci. Rep.* *6*.
- Kumar, R., Dhaliwal, H., Kukreja, R., and Singh, B. (2016). The Botulinum Toxin as a Therapeutic Agent: Molecular Structure and Mechanism of Action in Motor and Sensory Systems. *Semin. Neurol.* *36*, 010–019.
- Kwon, S.E., and Chapman, E.R. (2012). Glycosylation Is Dispensable for Sorting of Synaptotagmin 1 but Is Critical for Targeting of SV2 and Synaptophysin to Recycling Synaptic Vesicles. *J. Biol. Chem.* *287*, 35658–35668.

L

- Lacroix-Desmazes, S., Mouly, S., Popoff, M.-R., and Colosimo, C. (2017). Systematic analysis of botulinum neurotoxin type A immunogenicity in clinical studies. *Basal Ganglia* *9*, 12–17.
- Lacy, D.B., Tepp, W., Cohen, A.C., DasGupta, B.R., and Stevens, R.C. (1998). Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat. Struct. Biol.* *5*, 898–902.
- Laing, T.A., Laing, M.E., and O'Sullivan, S.T. (2008). Botulinum toxin for treatment of glandular hypersecretory disorders. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* *61*, 1024–1028.
- Lam, K.-H., and Jin, R. (2015). Architecture of the botulinum neurotoxin complex: a molecular machine for protection and delivery. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *31*, 89–95.
- Lamanna, C., Eklund, H.W., and McElroy, O.E. (1946). Botulinum Toxin (Type A); Including a Study of Shaking with Chloroform as a Step in the Isolation Procedure. *J. Bacteriol.* *52*, 1–13.
- Lancaster, M.A., and Huch, M. (2019). Disease modelling in human organoids. *Dis. Model. Mech.* *12*, dmm039347.
- Langhans, S.A. (2018). Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Front. Pharmacol.* *9*.
- Lapasset, L., Milhavet, O., Prieur, A., Besnard, E., Babled, A., Ait-Hamou, N., Leschik, J., Pellestor, F., Ramirez, J.-M., De Vos, J., et al. (2011). Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev.* *25*, 2248–2253.
- Laustriat, D., Gide, J., Barrault, L., Chautard, E., Benoit, C., Auboeuf, D., Boland, A., Battail, C., Artiguenave, F., Deleuze, J.-F., et al. (2015). In Vitro and In Vivo Modulation of Alternative Splicing by the Biguanide Metformin. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* *4*, e262.
- Lee, G., Papapetrou, E.P., Kim, H., Chambers, S.M., Tomishima, M.J., Fasano, C.A., Ganat, Y.M., Menon, J., Shimizu, F., Viale, A., et al. (2009). Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* *461*, 402–406.
- Lee, H., Shamy, G.A., Elkabetz, Y., Schofield, C.M., Harrision, N.L., Panagiotakos, G., Socci, N.D., Tabar, V., and Studer, L. (2007). Directed Differentiation and Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Motoneurons: DIRECTED DIFFERENTIATION AND TRANSPLANTATION OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELL-DERIVED MOTONEURONS. *STEM CELLS* *25*, 1931–1939.
- Lefort, N., Feyeux, M., Bas, C., Féraud, O., Bennaceur-Griscelli, A., Tachdjian, G., Peschanski, M., and Perrier, A.L. (2008). Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nat. Biotechnol.* *26*, 1364–1366.
- Lehtinen, M.K., Zappaterra, M.W., Chen, X., Yang, Y.J., Hill, A.D., Lun, M., Maynard, T., Gonzalez, D., Kim, S., Ye, P., et al. (2011). The Cerebrospinal Fluid Provides a Proliferative Niche for Neural Progenitor Cells. *Neuron* *69*, 893–905.

- Leone, D.P., Srinivasan, K., Chen, B., Alcamo, E., and McConnell, S.K. (2008). The determination of projection neuron identity in the developing cerebral cortex. *Curr. Opin. Neurobiol.* *18*, 28–35.
- Levine, A.J., and Brivanlou, A.H. (2007). Proposal of a model of mammalian neural induction. *Dev. Biol.* *308*, 247–256.
- Li, L., Xiong, W.-C., and Mei, L. (2018). Neuromuscular Junction Formation, Aging, and Disorders. *Annu. Rev. Physiol.* *80*, 159–188.
- Li, W., Cogswell, C.A., and LoTurco, J.J. (1998). Neuronal Differentiation of Precursors in the Neocortical Ventricular Zone Is Triggered by BMP. *J. Neurosci.* *18*, 8853–8862.
- Li, X.-J., Hu, B.-Y., Jones, S.A., Zhang, Y.-S., LaVaute, T., Du, Z.-W., and Zhang, S.-C. (2008). Directed Differentiation of Ventral Spinal Progenitors and Motor Neurons from Human Embryonic Stem Cells by Small Molecules. *Stem Cells* *26*, 886–893.
- Li, Y., McClintick, J., Zhong, L., Edenberg, H.J., Yoder, M.C., and Chan, R.J. (2005). Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood* *105*, 635–637.
- Liang, T., Qin, T., Kang, F., Kang, Y., Xie, L., Zhu, D., Dolai, S., Greitzer-Antes, D., Baker, R.K., Feng, D., et al. (2020). SNAP23 depletion enables more SNAP25/calcium channel excitosome formation to increase insulin exocytosis in type 2 diabetes. *JCI Insight* *5*.
- Liao, Y.-J., Chen, Y.-S., Lee, J.-X., Chen, L.-R., and Yang, J.-R. (2018). Effects of Klf4 and c-Myc Knockdown on Pluripotency Maintenance in Porcine Induced Pluripotent Stem Cell. *Cell J Yakhteh* *19*.
- Lim, E.C.H., and Seet, R.C.S. (2010). Use of botulinum toxin in the neurology clinic. *Nat. Rev. Neurol.* *6*, 624–636.
- Lim, M.-S., Shin, M.-S., Lee, S.Y., Minn, Y.-K., Hoh, J.-K., Cho, Y.-H., Kim, D.-W., Lee, S.-H., Kim, C.-H., and Park, C.-H. (2015). Noggin Over-Expressing Mouse Embryonic Fibroblasts and MS5 Stromal Cells Enhance Directed Differentiation of Dopaminergic Neurons from Human Embryonic Stem Cells. *PLOS ONE* *10*, e0138460.
- Lin, J.Y., Knutsen, P.M., Muller, A., Kleinfeld, D., and Tsien, R.Y. (2013). ReaChR: a red-shifted variant of channelrhodopsin enables deep transcranial optogenetic excitation. *Nat. Neurosci.* *16*, 1499–1508.
- Lin, X., Li, J.-J., Qian, W.-J., Zhang, Q.-J., Wang, Z.-F., Lu, Y.-Q., Dong, E.-L., He, J., Wang, N., Ma, L.-X., et al. (2017). Modeling the differential phenotypes of spinal muscular atrophy with high-yield generation of motor neurons from human induced pluripotent stem cells. *Oncotarget* *8*, 42030–42042.
- Liu, G., David, B.T., Trawczynski, M., and Fessler, R.G. (2020). Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Rev. Rep.* *16*, 3–32.
- Liu, Z., Cai, Y., Wang, Y., Nie, Y., Zhang, C., Xu, Y., Zhang, X., Lu, Y., Wang, Z., Poo, M., et al. (2018). Cloning of Macaque Monkeys by Somatic Cell Nuclear Transfer. *Cell* *172*, 881–887.e7.

Lock, J.T., Parker, I., and Smith, I.F. (2015). A comparison of fluorescent Ca²⁺ indicators for imaging local Ca²⁺ signals in cultured cells. *Cell Calcium* *58*, 638–648.

Loh, Y.-H., Agarwal, S., Park, I.-H., Urbach, A., Huo, H., Heffner, G.C., Kim, K., Miller, J.D., Ng, K., and Daley, G.Q. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* *113*, 5476–5479.

Lowenstein, P.R., and Castro, M.G. (2009). Uncertainty in the translation of preclinical experiments to clinical trials. Why do most phase III clinical trials fail? *Curr. Gene Ther.* *9*, 368–374.

Lu, K.P., and Means, A.R. (1993). Regulation of the Cell Cycle by Calcium and Calmodulin. *Endocr. Rev.* *14*, 40–58.

M

Maden, M. (2006). Retinoids and spinal cord development. *J. Neurobiol.* *66*, 726–738.

Maffioletti, S.M., Sarcar, S., Henderson, A.B.H., Mannhardt, I., Pinton, L., Moyle, L.A., Steele-Stallard, H., Cappellari, O., Wells, K.E., Ferrari, G., et al. (2018). Three-Dimensional Human iPSC-Derived Artificial Skeletal Muscles Model Muscular Dystrophies and Enable Multilineage Tissue Engineering. *Cell Rep.* *23*, 899–908.

Magli, A., Incitti, T., Kiley, J., Swanson, S.A., Darabi, R., Rinaldi, F., Selvaraj, S., Yamamoto, A., Tolar, J., Yuan, C., et al. (2017). PAX7 Targets, CD54, Integrin $\alpha 9\beta 1$, and SDC2, Allow Isolation of Human ESC/iPSC-Derived Myogenic Progenitors. *Cell Rep.* *19*, 2867–2877.

Mahalatchimy, A., and Rial-Sebbag, E. (2017). Regulation of stem cell research in France. *HAL*.

Mahmoudi, S., and Brunet, A. (2012). Aging and reprogramming: a two-way street. *Curr. Opin. Cell Biol.* *24*, 744–756.

Maignel-Ludop, J., Huchet, M., and Krupp, J. (2017). Botulinum Neurotoxins Serotypes A and B induce paralysis of mouse striated and smooth muscles with different potencies. *Pharmacol. Res. Perspect.* *5*, e00289.

Maitra, A., Arking, D.E., Shivapurkar, N., Ikeda, M., Stastny, V., Kassauei, K., Sui, G., Cutler, D.J., Liu, Y., Brimble, S.N., et al. (2005). Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nat. Genet.* *37*, 1099–1103.

Malenka, R.C., Kauer, J.A., Perkel, D.J., and Nicoll, R.A. (1989). The impact of postsynaptic calcium on synaptic transmission — its role in long-term potentiation. *Trends Neurosci.* *12*, 444–450.

Mali, P., Chou, B.-K., Yen, J., Ye, Z., Zou, J., Dowey, S., Brodsky, R.A., Ohm, J.E., Yu, W., Baylin, S.B., et al. (2010). Butyrate Greatly Enhances Derivation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Promoting Epigenetic Remodeling and the Expression of Pluripotency-Associated Genes. *STEM CELLS* *28*, 713–720.

Mallory, G.W., Grahn, P.J., Hachmann, J.T., Lujan, J.L., and Lee, K.H. (2015). Optical Stimulation for Restoration of Motor Function After Spinal Cord Injury. *Mayo Clin. Proc.* *90*, 300–307.

- Mamchaoui, K., Trollet, C., Bigot, A., Negroni, E., Chaouch, S., Wolff, A., Kandalla, P.K., Marie, S., Di Santo, J., St Guily, J., et al. (2011). Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. *Skelet. Muscle* 1, 34.
- Mandai, M., Watanabe, A., Kurimoto, Y., Hiramami, Y., Morinaga, C., Daimon, T., Fujihara, M., Akimaru, H., Sakai, N., Shibata, Y., et al. (2017). Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* 376, 1038–1046.
- Marchetto, M.C., Belinson, H., Tian, Y., Freitas, B.C., Fu, C., Vadodaria, K.C., Beltrao-Braga, P.C., Trujillo, C.A., Mendes, A.P.D., Padmanabhan, K., et al. (2017). Altered proliferation and networks in neural cells derived from idiopathic autistic individuals. *Mol. Psychiatry* 22, 820–835.
- Mariani, J., Simonini, M.V., Palejev, D., Tomasini, L., Coppola, G., Szekely, A.M., Horvath, T.L., and Vaccarino, F.M. (2012). Modeling human cortical development in vitro using induced pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 12770–12775.
- Maroof, A.M., Brown, K., Shi, S.H., Studer, L., and Anderson, S.A. (2010). Prospective Isolation of Cortical Interneuron Precursors from Mouse Embryonic Stem Cells. *J. Neurosci.* 30, 4667–4675.
- Marteyn, A., Maury, Y., Gauthier, M.M., Lecuyer, C., Vernet, R., Denis, J.A., Pietu, G., Peschanski, M., and Martinat, C. (2011). Mutant Human Embryonic Stem Cells Reveal Neurite and Synapse Formation Defects in Type 1 Myotonic Dystrophy. *Cell Stem Cell* 8, 434–444.
- Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 7634–7638.
- Martínez-Lozada, Z., and Ortega, A. (2015). Glutamatergic Transmission: A Matter of Three. *Neural Plast.* 2015, 1–11.
- Martyn, J.A.J., Fagerlund, M.J., and Eriksson, L.I. (2009). Basic principles of neuromuscular transmission. *Anaesthesia* 64, 1–9.
- Maslanka, S.E., Lúquez, C., Dykes, J.K., Tepp, W.H., Pier, C.L., Pellett, S., Raphael, B.H., Kalb, S.R., Barr, J.R., Rao, A., et al. (2016). A Novel Botulinum Neurotoxin, Previously Reported as Serotype H, Has a Hybrid-Like Structure With Regions of Similarity to the Structures of Serotypes A and F and Is Neutralized With Serotype A Antitoxin. *J. Infect. Dis.* 213, 379–385.
- Masuyer, G., Chaddock, J.A., Foster, K.A., and Acharya, K.R. (2014). Engineered Botulinum Neurotoxins as New Therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 54, 27–51.
- Masuyer, G., Zhang, S., Barkho, S., Shen, Y., Henriksson, L., Košenina, S., Dong, M., and Stenmark, P. (2018). Structural characterisation of the catalytic domain of botulinum neurotoxin X - high activity and unique substrate specificity. *Sci. Rep.* 8.
- Matoba, S., and Zhang, Y. (2018). Somatic Cell Nuclear Transfer Reprogramming: Mechanisms and Applications. *Cell Stem Cell* 23, 471–485.
- Matveeva, N.M., Shilov, A.G., Kaftanovskaya, E.M., Maximovsky, L.P., Zhelezova, A.I., Golubitsa, A.N., Bayborodin, S.I., Fokina, M.M., and Serov, O.L. (1998). In vitro and in vivo study of pluripotency in

- intraspecific hybrid cells obtained by fusion of murine embryonic stem cells with splenocytes. *Mol. Reprod. Dev.* *50*, 128–138.
- Maury, Y., Côme, J., Piskorowski, R.A., Salah-Mohellibi, N., Chevalyere, V., Peschanski, M., Martinat, C., and Nedelec, S. (2015). Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes. *Nat. Biotechnol.* *33*, 89.
- Mazaleyrat, K., Badja, C., Broucqsaault, N., Chevalier, R., Laberthonnière, C., Dion, C., Baldasseroni, L., El-Yazidi, C., Thomas, M., Bachelier, R., et al. (2020). Multilineage Differentiation for Formation of Innervated Skeletal Muscle Fibers from Healthy and Diseased Human Pluripotent Stem Cells. *Cells* *9*, 1531.
- McNeish, J., Gardner, J.P., Wainger, B.J., Woolf, C.J., and Eggan, K. (2015). From Dish to Bedside: Lessons Learned While Translating Findings from a Stem Cell Model of Disease to a Clinical Trial. *Cell Stem Cell* *17*, 8–10.
- Mehta, S.R., Tom, C.M., Wang, Y., Bresee, C., Rushton, D., Mathkar, P.P., Tang, J., and Mattis, V.B. (2018). Human Huntington's Disease iPSC-Derived Cortical Neurons Display Altered Transcriptomics, Morphology, and Maturation. *Cell Rep.* *25*, 1081-1096.e6.
- Meyer, K.F., and Gunnison, J.B. (1928). Cl. Botulinum Type D Sp. N. *Exp. Biol. Med.* *26*, 88–89.
- Miles, R., and Poncer, J.-C. (1996). Paired recordings from neurones. *Curr. Opin. Neurobiol.* *6*, 387–394.
- Miller, R.A., and Ruddle, F.H. (1976). Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids. *Cell* *9*, 45–55.
- Mima, K., Donai, H., and Yamauchi, T. (2001). Investigation of neuronal cell type-specific gene expression of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biol. Proced. Online* *3*, 79–89.
- Mitalipov, S.M., and Wolf, D.P. (2006). Nuclear Transfer in Nonhuman Primates. In *Nuclear Transfer Protocols*, P.J. Verma, and A.O. Trounson, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 151–168.
- Mithöfer, A., and Mazars, C. (2002). Aequorin-based measurements of intracellular Ca²⁺-signatures in plant cells. *Biol. Proced. Online* *4*, 105–118.
- Miyashita, S.-I., Sagane, Y., Suzuki, T., Matsumoto, T., Niwa, K., and Watanabe, T. (2016). "Non-Toxic" Proteins of the Botulinum Toxin Complex Exert In-vivo Toxicity. *Sci. Rep.* *6*.
- Mohanty, S.K., and Lakshminarayanan, V. (2015). Optical techniques in optogenetics. *J. Mod. Opt.* *62*, 949–970.
- Møller, V., and Scheibel, I. (2009). PRELIMINARY REPORT ON THE ISOLATION OF AN APPARENTLY NEW TYPE OF CL. BOTULINUM. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* *48*, 80–80.
- Mollinedo-Gajate, I., Song, C., and Knöpfel, T. (2019). Genetically Encoded Fluorescent Calcium and Voltage Indicators. In *Concepts and Principles of Pharmacology*, J.E. Barrett, C.P. Page, and M.C. Michel, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 209–229.

- Molnár, Z., Clowry, G.J., Šestan, N., Alzu'bi, A., Bakken, T., Hevner, R.F., Hüppi, P.S., Kostović, I., Rakic, P., Anton, E.S., et al. (2019). New insights into the development of the human cerebral cortex. *J. Anat.* *235*, 432–451.
- Molyneaux, B.J., Arlotta, P., Menezes, J.R.L., and Macklis, J.D. (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat. Rev. Neurosci.* *8*, 427–437.
- Monani, U.R. (2000). The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn*^{-/-} mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 333–339.
- Monheit, G.D., and Pickett, A. (2017). AbobotulinumtoxinA: A 25-Year History. *Aesthet. Surg. J.* *37*, S4–S11.
- Montagni, E., Resta, F., Mascaro, A.L.A., and Pavone, F.S. (2019). Optogenetics in Brain Research: From a Strategy to Investigate Physiological Function to a Therapeutic Tool. *Photonics* *6*, 92.
- Montal, M. (2010). Botulinum Neurotoxin: A Marvel of Protein Design. *Annu. Rev. Biochem.* *79*, 591–617.
- Montecucco, C. (1995). Clostridial Neurotoxins: the Molecular Pathogenesis of Tetanus and Botulism. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin / Heidelberg).
- Montecucco, C., Schiavo, G., and Dasgupta, B.R. (1989). Effect of pH on the interaction of botulinum neurotoxins A, B and E with liposomes. *Biochem. J.* *259*, 47–53.
- Montecucco, C., Schiavo, G., Tugnoli, V., and de Grandis, D. (1996). Botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic applications. *Mol. Med. Today* *2*, 418–424.
- Montecucco, C., Rossetto, O., and Schiavo, G. (2004). Presynaptic receptor arrays for clostridial neurotoxins. *Trends Microbiol.* *12*, 442–446.
- MuhChyi, C., Juliandi, B., Matsuda, T., and Nakashima, K. (2013). Epigenetic regulation of neural stem cell fate during corticogenesis. *Int. J. Dev. Neurosci.* *31*, 424–433.
- Mukhtar, T., and Taylor, V. (2018). Untangling Cortical Complexity During Development. *J. Exp. Neurosci.* *12*, 117906951875933.
- Mullard, A. (2015). Stem-cell discovery platforms yield first clinical candidates. *Nat. Rev. Drug Discov.* *14*, 589–591.
- Muñoz-Sanjuán, I., and Brivanlou, A.H. (2002). Neural induction, the default model and embryonic stem cells. *Nat. Rev. Neurosci.* *3*, 271–280.

N

- Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvili, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P., and Bamberg, E. (2003). Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 13940–13945.

- Naryshkin, N.A., Weetall, M., Dakka, A., Narasimhan, J., Zhao, X., Feng, Z., Ling, K.K.Y., Karp, G.M., Qi, H., Woll, M.G., et al. (2014). Motor neuron disease. SMN2 splicing modifiers improve motor function and longevity in mice with spinal muscular atrophy. *Science* *345*, 688–693.
- Natarajan, A., Sethumadhavan, A., and Krishnan, U.M. (2019). Toward Building the Neuromuscular Junction: In Vitro Models To Study Synaptogenesis and Neurodegeneration. *ACS Omega* *4*, 12969–12977.
- Neganova, I., Chichagova, V., Armstrong, L., and Lako, M. (2017). A critical role for p38MAPK signalling pathway during reprogramming of human fibroblasts to iPSCs. *Sci. Rep.* *7*.
- Nelakanti, R.V., Kooreman, N.G., and Wu, J.C. (2015). Teratoma Formation: A Tool for Monitoring Pluripotency in Stem Cell Research. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* *32*.
- Nepal, M.R., and Jeong, T.C. (2020). Alternative Methods for Testing Botulinum Toxin: Current Status and Future Perspectives. *Biomol. Ther.* *28*, 302–310.
- Nicholas, C.R., Chen, J., Tang, Y., Southwell, D.G., Chalmers, N., Vogt, D., Arnold, C.M., Chen, Y.-J.J., Stanley, E.G., Elefanty, A.G., et al. (2013). Functional Maturation of hPSC-Derived Forebrain Interneurons Requires an Extended Timeline and Mimics Human Neural Development. *Cell Stem Cell* *12*, 573–586.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., and Smith, A. (1998). Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4. *Cell* *95*, 379–391.
- Nicoleau, C., Viegas, P., Peschanski, M., and Perrier, A.L. (2011). Human Pluripotent Stem Cell Therapy for Huntington's Disease: Technical, Immunological, and Safety Challenges. *Neurotherapeutics* *8*, 562–576.
- Nicoleau, C., De Lamotte, J.D., Raban, E., Boude, E., Noirmain, F., and Krupp, J. (2018a). Assessment of multiple hiPSC-derived models for botulinum neurotoxin testing. *Toxicol* *156*, S85.
- Nicoleau, C., Donald, S., Pons, L., De Lamotte, J.D., Raban, E., Fonfria, E., and Krupp, J. (2018b). Translational value of hiPSC-derived models for botulinum neurotoxin research. *Toxicol* *156*, S84–S85.
- Nieto-Estévez, V., Defterali, Ç., and Vicario-Abejón, C. (2016). IGF-I: A Key Growth Factor that Regulates Neurogenesis and Synaptogenesis from Embryonic to Adult Stages of the Brain. *Front. Neurosci.* *10*.
- Nikolić, N., Görgens, S.W., Thoresen, G.H., Aas, V., Eckel, J., and Eckardt, K. (2017). Electrical pulse stimulation of cultured skeletal muscle cells as a model for *in vitro* exercise - possibilities and limitations. *Acta Physiol.* *220*, 310–331.
- Novellino, A., and Zaldívar, J.-M. (2010). Recurrence Quantification Analysis of Spontaneous Electrophysiological Activity during Development: Characterization of In Vitro Neuronal Networks Cultured on Multi Electrode Array Chips. *Adv. Artif. Intell.* *2010*, 1–10.

O

Obien, M.E.J., Deligkaris, K., Bullmann, T., Bakkum, D.J., and Frey, U. (2015). Revealing neuronal function through microelectrode array recordings. *Front. Neurosci.* *8*.

Odawara, A., Matsuda, N., Ishibashi, Y., Yokoi, R., and Suzuki, I. (2018). Toxicological evaluation of convulsant and anticonvulsant drugs in human induced pluripotent stem cell-derived cortical neuronal networks using an MEA system. *Sci. Rep.* *8*.

Oh, S.-I., Lee, C.K., Cho, K.J., Lee, K.-O., Cho, S.-G., and Hong, S. (2012). Technological Progress in Generation of Induced Pluripotent Stem Cells for Clinical Applications. *Sci. World J.* *2012*, 1–10.

Ohtsuka, S., Nakai-Futatsugi, Y., and Niwa, H. (2015). LIF signal in mouse embryonic stem cells. *JAK-STAT* *4*, 1–9.

Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* *448*, 313–317.

Omole, A.E., and Fakoya, A.O.J. (2018). Ten years of progress and promise of induced pluripotent stem cells: historical origins, characteristics, mechanisms, limitations, and potential applications. *PeerJ* *6*, e4370.

Ordaz, J., Wu, W., and Xu, X.-M. (2017). Optogenetics and its application in neural degeneration and regeneration. *Neural Regen. Res.* *12*, 1197.

Orrenius, S., Zhivotovsky, B., and Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 552–565.

Osaki, T., Uzel, S.G.M., and Kamm, R.D. (2018). Microphysiological 3D model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) from human iPS-derived muscle cells and optogenetic motor neurons. *Sci. Adv.* *4*, eaat5847.

Osaki, T., Uzel, S.G.M., and Kamm, R.D. (2020). On-chip 3D neuromuscular model for drug screening and precision medicine in neuromuscular disease. *Nat. Protoc.* *15*, 421–449.

O’Shea, R. (2002). Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *29*, 1018–1023.

P

de Paiva, A., Meunier, F.A., Molgo, J., Aoki, K.R., and Dolly, J.O. (1999). Functional repair of motor endplates after botulinum neurotoxin type A poisoning: Biphasic switch of synaptic activity between nerve sprouts and their parent terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 3200–3205.

Pamphlett, R. (1989). Early terminal and nodal sprouting of motor axons after botulinum toxin. *J. Neurol. Sci.* *92*, 181–192.

Pancrazio, J.J., Gopal, K., Keefer, E.W., and Gross, G.W. (2014). Botulinum Toxin Suppression of CNS Network Activity *In Vitro*. *J. Toxicol.* *2014*, 1–10.

- Pang, Z.P., and Südhof, T.C. (2010). Cell biology of Ca²⁺-triggered exocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* *22*, 496–505.
- Pang, Z.P., Melicoff, E., Padgett, D., Liu, Y., Teich, A.F., Dickey, B.F., Lin, W., Adachi, R., and Sudhof, T.C. (2006). Synaptotagmin-2 Is Essential for Survival and Contributes to Ca²⁺ Triggering of Neurotransmitter Release in Central and Neuromuscular Synapses. *J. Neurosci.* *26*, 13493–13504.
- Paredes, R.M., Etzler, J.C., Watts, L.T., Zheng, W., and Lechleiter, J.D. (2008). Chemical calcium indicators. *Methods* *46*, 143–151.
- Park, J., and Park, H. (2017). Botulinum Toxin for the Treatment of Neuropathic Pain. *Toxins* *9*, 260.
- Park, I.-H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., and Daley, G.Q. (2008). Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell* *134*, 877–886.
- Patten, B.A. (2006). Notch1 Signaling Regulates Radial Glia Differentiation through Multiple Transcriptional Mechanisms. *J. Neurosci.* *26*, 3102–3108.
- Pearce, L.B., Borodic, G.E., First, E.R., and Maccallum, R.D. (1994). Measurement of Botulinum Toxin Activity: Evaluation of the Lethality Assay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *128*, 69–77.
- Peck, M., Smith, T., Anniballi, F., Austin, J., Bano, L., Bradshaw, M., Cuervo, P., Cheng, L., Derman, Y., Dorner, B., et al. (2017). Historical Perspectives and Guidelines for Botulinum Neurotoxin Subtype Nomenclature. *Toxins* *9*, 38.
- Pelletier-Cameron, A., and Cox, L. (2014). OnabotulinumtoxinA for the treatment of overactive bladder. *Res. Rep. Urol.* *79*.
- Pellett, S. (2013). Progress in Cell Based Assays for Botulinum Neurotoxin Detection. In *Botulinum Neurotoxins*, A. Rummel, and T. Binz, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 257–285.
- Pellett, S., Tepp, W.H., Clancy, C.M., Borodic, G.E., and Johnson, E.A. (2007). A neuronal cell-based botulinum neurotoxin assay for highly sensitive and specific detection of neutralizing serum antibodies. *FEBS Lett.* *581*, 4803–4808.
- Pellett, S., Tepp, W.H., Scherf, J.M., and Johnson, E.A. (2015). Botulinum Neurotoxins Can Enter Cultured Neurons Independent of Synaptic Vesicle Recycling. *PLOS ONE* *10*, e0133737.
- Pellett, S., Tepp, W.H., Lin, G., and Johnson, E.A. (2018). Substrate cleavage and duration of action of botulinum neurotoxin type FA (“H, HA”). *Toxicon* *147*, 38–46.
- Pellett, S., Tepp, W.H., and Johnson, E.A. (2019). Botulinum neurotoxins A, B, C, E, and F preferentially enter cultured human motor neurons compared to other cultured human neuronal populations. *FEBS Lett.*

- Peng, L., Berntsson, R.P.-A., Tepp, W.H., Pitkin, R.M., Johnson, E.A., Stenmark, P., and Dong, M. (2012). Botulinum neurotoxin D-C uses synaptotagmin I and II as receptors, and human synaptotagmin II is not an effective receptor for type B, D-C and G toxins. *J. Cell Sci.* *125*, 3233–3242.
- Peng Chen, Z., Morris, J., Rodriguez, R., Shukla, A., Tapia-Núñez, J., and Okun, M. (2012). Emerging Opportunities for Serotypes of Botulinum Neurotoxins. *Toxins* *4*, 1196–1222.
- Pérez Koldenkova, V., and Nagai, T. (2013). Genetically encoded Ca²⁺ indicators: Properties and evaluation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1833*, 1787–1797.
- Perrier, A.L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M.E., Bruses, J., Topf, N., Harrison, N.L., and Studer, L. (2004). Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 12543–12548.
- Peterson, E.R., Crain, S.M., and Murray, M.R. (1965). Differentiation and prolonged maintenance of bioelectrically active spinal cord cultures (rat, chick and human). *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* *66*, 130–154.
- Petros, T.J., Tyson, J.A., and Anderson, S.A. (2011). Pluripotent Stem Cells for the Study of CNS Development. *Front. Mol. Neurosci.* *4*.
- Pier, C.L., Chen, C., Tepp, W.H., Lin, G., Janda, K.D., Barbieri, J.T., Pellett, S., and Johnson, E.A. (2011). Botulinum neurotoxin subtype A2 enters neuronal cells faster than subtype A1. *FEBS Lett.* *585*, 199–206.
- Pirazzini, M., Bordin, F., Rossetto, O., Shone, C.C., Binz, T., and Montecucco, C. (2013). The thioredoxin reductase-thioredoxin system is involved in the entry of tetanus and botulinum neurotoxins in the cytosol of nerve terminals. *FEBS Lett.* *587*, 150–155.
- Pirazzini, M., Azarnia Tehran, D., Zanetti, G., Megighian, A., Scorzeto, M., Fillo, S., Shone, C.C., Binz, T., Rossetto, O., Lista, F., et al. (2014). Thioredoxin and Its Reductase Are Present on Synaptic Vesicles, and Their Inhibition Prevents the Paralysis Induced by Botulinum Neurotoxins. *Cell Rep.* *8*, 1870–1878.
- Pirazzini, M., Rossetto, O., Eleopra, R., and Montecucco, C. (2017). Botulinum Neurotoxins: Biology, Pharmacology, and Toxicology. *Pharmacol. Rev.* *69*, 200–235.
- Podor, B., Hu, Y., Ohkura, M., Nakai, J., Croll, R., and Fine, A. (2015). Comparison of genetically encoded calcium indicators for monitoring action potentials in mammalian brain by two-photon excitation fluorescence microscopy. *Neurophotonics* *2*, 021014.
- Pons, L., Vilain, C., Volteau, M., and Picaut, P. (2019). Safety and pharmacodynamics of a novel recombinant botulinum toxin E (rBoNT-E): Results of a phase 1 study in healthy male subjects compared with abobotulinumtoxinA (Dysport®). *J. Neurol. Sci.* *407*, 116516.
- Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B.S., and Sanacora, G. (2012). The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat. Rev. Neurosci.* *13*, 22–37.

Poulain, B., and Humeau, Y. (2003). Le mode d'action des neurotoxines botuliques : aspects pathologiques, cellulaires et moléculaires. *Ann. Réadapt. Médecine Phys.* *46*, 265–275.

Poulain, B., and Popoff, M. (2019). Why Are Botulinum Neurotoxin-Producing Bacteria So Diverse and Botulinum Neurotoxins So Toxic? *Toxins* *11*, 34.

Poulain, B., and Popoff, M.R. (2020). Neurotoxine botulique : mécanismes moléculaires et cellulaires de son action sur le système nerveux. *Bull. Académie Natl. Médecine* *204*, 369–378.

Puri, B.K. (2020). Calcium Signaling and Gene Expression. In *Calcium Signaling*, M.S. Islam, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 537–545.

Purkiss, J.R., Friis, L.M., Doward, S., and Quinn, C.P. (2001). Clostridium botulinum Neurotoxins Act with a Wide Range of Potencies on SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cells. *NeuroToxicology* *22*, 447–453.

Purves, D., Williams, S.M. (2001). *Neuroscience* (Sunderland, Mass: Sinauer Associates).

Puttonen, K.A., Ruponen, M., Naumenko, N., Hovatta, O.H., Tavi, P., and Koistinaho, J. (2015). Generation of Functional Neuromuscular Junctions from Human Pluripotent Stem Cell Lines. *Front. Cell. Neurosci.* *9*.

Q

Qu, Q., Li, D., Louis, K.R., Li, X., Yang, H., Sun, Q., Crandall, S.R., Tsang, S., Zhou, J., Cox, C.L., et al. (2014). High-efficiency motor neuron differentiation from human pluripotent stem cells and the function of Islet-1. *Nat. Commun.* *5*.

Quadros, A.U., Pinto, L.G., Fonseca, M.M., Kusuda, R., Cunha, F.Q., and Cunha, T.M. (2015). Dynamic weight bearing is an efficient and predictable method for evaluation of arthritic nociception and its pathophysiological mechanisms in mice. *Sci. Rep.* *5*.

R

Rall, J.A. (2014). *Mechanism of muscular contraction* (New York: Springer).

Ramirez-Castaneda, J., Jankovic, J., Comella, C., Dashtipour, K., Fernandez, H.H., and Mari, Z. (2013). Diffusion, spread, and migration of botulinum toxin: Diffusion, Spread, and Migration of BoNT. *Mov. Disord.* *28*, 1775–1783.

Rasetti-Escargueil, C., and Popoff, M.R. (2020). Engineering Botulinum Neurotoxins for Enhanced Therapeutic Applications and Vaccine Development. *Toxins* *13*, 1.

Rasetti-Escargueil, C., Jones, R.G.A., Liu, Y., and Sesardic, D. (2009). Measurement of botulinum types A, B and E neurotoxicity using the phrenic nerve–hemidiaphragm: Improved precision with in-bred mice. *Toxicon* *53*, 503–511.

- Rasetti-Escargueil, C., Liu, Y., Rigsby, P., Jones, R.G.A., and Sesardic, D. (2011). Phrenic nerve-hemidiaphragm as a highly sensitive replacement assay for determination of functional botulinum toxin antibodies. *Toxicon* 57, 1008–1016.
- Rasooly, R., and Do, P.M. (2008). Development of an In Vitro Activity Assay as an Alternative to the Mouse Bioassay for Clostridium botulinum Neurotoxin Type A. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4309–4313.
- Ravichandran, V., Chawla, A., and Roche, P.A. (1996). Identification of a Novel Syntaxin- and Synaptobrevin/VAMP-binding Protein, SNAP-23, Expressed in Non-neuronal Tissues. *J. Biol. Chem.* 271, 13300–13303.
- Ray, P. (1993). Botulinum toxin a inhibits acetylcholine release from cultured neurons in vitro. *Vitro Cell. Dev. Biol. - Anim.* 29, 456–460.
- Restani, L., Giribaldi, F., Manich, M., Bercsenyi, K., Menendez, G., Rossetto, O., Caleo, M., and Schiavo, G. (2012). Botulinum Neurotoxins A and E Undergo Retrograde Axonal Transport in Primary Motor Neurons. *PLoS Pathog.* 8, e1003087.
- Rhéaume, C., Cai, B., Wang, J., Fernández-Salas, E., Aoki, K., Francis, J., and Broide, R. (2015). A Highly Specific Monoclonal Antibody for Botulinum Neurotoxin Type A-Cleaved SNAP25. *Toxins* 7, 2354–2370.
- Ribes, V., and Briscoe, J. (2009). Establishing and Interpreting Graded Sonic Hedgehog Signaling during Vertebrate Neural Tube Patterning: The Role of Negative Feedback. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a002014–a002014.
- Richard, J.-P., and Maragakis, N.J. (2015). Induced pluripotent stem cells from ALS patients for disease modeling. *Brain Res.* 1607, 15–25.
- Rizo, J., and Rosenmund, C. (2008). Synaptic vesicle fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 665–674.
- Robinson, H.P., Kawahara, M., Jimbo, Y., Torimitsu, K., Kuroda, Y., and Kawana, A. (1993). Periodic synchronized bursting and intracellular calcium transients elicited by low magnesium in cultured cortical neurons. *J. Neurophysiol.* 70, 1606–1616.
- Ronchi, S., Buccino, A.P., Prack, G., Kumar, S.S., Schröter, M., Fiscella, M., and Hierlemann, A. (2020). Electrophysiological Phenotype Characterization of Human iPSC-Derived Neuronal Cell Lines by Means of High-Density Microelectrode Arrays (Neuroscience).
- Rossetto, O. (2018). Botulinum Toxins: Molecular Structures and Synaptic Physiology. In *Botulinum Toxin Treatment in Clinical Medicine*, B. Jabbari, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 1–12.
- Rossetto, O., Pirazzini, M., and Montecucco, C. (2014). Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 535–549.

Rubenstein, J.L.R. (2011). Annual Research Review: Development of the cerebral cortex: implications for neurodevelopmental disorders: Development of the cerebral cortex. *J. Child Psychol. Psychiatry* *52*, 339–355.

Rummel, A. (2016). Two Feet on the Membrane: Uptake of Clostridial Neurotoxins. In *Uptake and Trafficking of Protein Toxins*, H. Barth, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 1–37.

Rummel, A., Eichner, T., Weil, T., Karnath, T., Gutcaits, A., Mahrhold, S., Sandhoff, K., Proia, R.L., Acharya, K.R., Bigalke, H., et al. (2007). Identification of the protein receptor binding site of botulinum neurotoxins B and G proves the double-receptor concept. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 359–364.

Rummel, A., Häfner, K., Mahrhold, S., Darashchonak, N., Holt, M., Jahn, R., Beermann, S., Karnath, T., Bigalke, H., and Binz, T. (2009). Botulinum neurotoxins C, E and F bind gangliosides via a conserved binding site prior to stimulation-dependent uptake with botulinum neurotoxin F utilising the three isoforms of SV2 as second receptor. *J. Neurochem.* *110*, 1942–1954.

Rust, A., Doran, C., Hart, R., Binz, T., Stickings, P., Sesardic, D., Peden, A.A., and Davletov, B. (2017). A Cell Line for Detection of Botulinum Neurotoxin Type B. *Front. Pharmacol.* *8*.

S

Sahara, S., and O’Leary, D.D.M. (2009). Fgf10 Regulates Transition Period of Cortical Stem Cell Differentiation to Radial Glia Controlling Generation of Neurons and Basal Progenitors. *Neuron* *63*, 48–62.

Sambasivan, R., Yao, R., Kissenpfennig, A., Van Wittenberghe, L., Paldi, A., Gayraud-Morel, B., Guenou, H., Malissen, B., Tajbakhsh, S., and Galy, A. (2011). Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration. *Development* *138*, 3647–3656.

Samotus, O., Lee, J., and Jog, M. (2018). Transitioning from Unilateral to Bilateral Upper Limb Tremor Therapy for Parkinson’s Disease and Essential Tremor Using Botulinum Toxin: Case Series. *Toxins* *10*, 394.

Sanes, J.R., and Lichtman, J.W. (1999). DEVELOPMENT OF THE VERTEBRATE NEUROMUSCULAR JUNCTION. *Annu. Rev. Neurosci.* *22*, 389–442.

Santhanam, N., Kumanchik, L., Guo, X., Sommerhage, F., Cai, Y., Jackson, M., Martin, C., Saad, G., McAleer, C.W., Wang, Y., et al. (2018). Stem cell derived phenotypic human neuromuscular junction model for dose response evaluation of therapeutics. *Biomaterials* *166*, 64–78.

Sarkar, A., Mei, A., Paquola, A.C.M., Stern, S., Bardy, C., Klug, J.R., Kim, S., Neshat, N., Kim, H.J., Ku, M., et al. (2018). Efficient Generation of CA3 Neurons from Human Pluripotent Stem Cells Enables Modeling of Hippocampal Connectivity In Vitro. *Cell Stem Cell* *22*, 684–697.e9.

Satriyasa, B.K. (2019). Botulinum toxin (Botox) A for reducing the appearance of facial wrinkles: a literature review of clinical use and pharmacological aspect. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol. Volume* *12*, 223–228.

- Scemes, E., and Giaume, C. (2006). Astrocyte calcium waves: What they are and what they do. *Glia* *54*, 716–725.
- Schenke, M., Schjeide, B.-M., Püschel, G.P., and Seeger, B. (2020). Analysis of Motor Neurons Differentiated from Human Induced Pluripotent Stem Cells for the Use in Cell-Based Botulinum Neurotoxin Activity Assays. *Toxins* *12*, 276.
- Schiavo, G., Santucci, A., Dasgupta, B.R., Mehta, P.P., Jontes, J., Benfenati, F., Wilson, M.C., and Montecucco, C. (1993). Botulinum neurotoxins serotypes A and E cleave SNAP-25 at distinct COOH-terminal peptide bonds. *FEBS Lett.* *335*, 99–103.
- Schiavo, G., Matteoli, M., and Montecucco, C. (2000). Neurotoxins Affecting Neuroexocytosis. *Physiol. Rev.* *80*, 717–766.
- Schnaar, R.L. (2016). Gangliosides of the Vertebrate Nervous System. *J. Mol. Biol.* *428*, 3325–3336.
- Schwartz, C.M., Tavakoli, T., Jamias, C., Park, S.-S., Maudsley, S., Martin, B., Phillips, T.M., Yao, P.J., Itoh, K., Ma, W., et al. (2012). Stromal factors SDF1 α , sFRP1, and VEGFD induce dopaminergic neuron differentiation of human pluripotent stem cells. *J. Neurosci. Res.* *90*, 1367–1381.
- Scott, A.B. (1981). Botulinum toxin injection of eye muscles to correct strabismus. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* *79*, 734–770.
- Sebille, S., Ayad, O., Chapotte-Baldacci, C.-A., Cognard, C., Bois, P., and Chatelier, A. (2017). Optogenetic approach for targeted activation of global calcium transients in differentiated C2C12 myotubes. *Sci. Rep.* *7*.
- Sengupta, A., Chaffiol, A., Macé, E., Caplette, R., Desrosiers, M., Lampič, M., Forster, V., Marre, O., Lin, J.Y., Sahel, J., et al. (2016). Red-shifted channelrhodopsin stimulation restores light responses in blind mice, macaque retina, and human retina. *EMBO Mol. Med.* *8*, 1248–1264.
- Sesardic, D., Leung, T., and Gaines Das, R. (2003). Role for standards in assays of botulinum toxins: international collaborative study of three preparations of botulinum type A toxin. *Biologicals* *31*, 265–276.
- Seyhan, A.A. (2019). Lost in translation: the valley of death across preclinical and clinical divide – identification of problems and overcoming obstacles. *Transl. Med. Commun.* *4*.
- Shaari, C.M., George, E., Wu, B.-L., Biller, H.F., and Sanders, I. (1991). Quantifying the Spread of Botulinum Toxin Through Muscle Fascia: The Laryngoscope *101*, 960–964.
- Shapiro, R.L. (1998). Botulism in the United States: A Clinical and Epidemiologic Review. *Ann. Intern. Med.* *129*, 221.
- Shen, Y., Campbell, R.E., Côté, D.C., and Paquet, M.-E. (2020). Challenges for Therapeutic Applications of Opsin-Based Optogenetic Tools in Humans. *Front. Neural Circuits* *14*.
- Sheridan, R.E., Smith, T.J., and Adler, M. (2005). Primary cell culture for evaluation of botulinum neurotoxin antagonists. *Toxicon* *45*, 377–382.

- Shi, Y., Tae Do, J., Desponts, C., Hahm, H.S., Schöler, H.R., and Ding, S. (2008). A Combined Chemical and Genetic Approach for the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* *2*, 525–528.
- Shi, Y., Kirwan, P., Smith, J., Robinson, H.P.C., and Livesey, F.J. (2012a). Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. *Nat. Neurosci.* *15*, 477–486.
- Shi, Y., Kirwan, P., and Livesey, F.J. (2012b). Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks. *Nat. Protoc.* *7*, 1836–1846.
- Shibasaki, M., Davis, S.L., Cui, J., Low, D.A., Keller, D.M., and Crandall, C.G. (2009). Botulinum toxin abolishes sweating via impaired sweat gland responsiveness to exogenous acetylcholine. *Br. J. Dermatol.* *161*, 757–761.
- Shimamura, K., Hartigan, D.J., Martinez, S., Puelles, L., and Rubenstein, J.L. (1995). Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube. *Dev. Camb. Engl.* *121*, 3923–3933.
- Shimogori, T. (2004). Embryonic signaling centers expressing BMP, WNT and FGF proteins interact to pattern the cerebral cortex. *Development* *131*, 5639–5647.
- Shimojo, D., Onodera, K., Doi-Torii, Y., Ishihara, Y., Hattori, C., Miwa, Y., Tanaka, S., Okada, R., Ohyama, M., Shoji, M., et al. (2015). Rapid, efficient, and simple motor neuron differentiation from human pluripotent stem cells. *Mol. Brain* *8*.
- Siddoway, B., Hou, H., and Xia, H. (2011). Glutamatergic Synapses: Molecular Organisation. In ELS, John Wiley & Sons, Ltd, ed. (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), p.
- Sikorra, S., Donald, S., Elliott, M., Schwede, S., Coker, S.-F., Kupinski, A.P., Tripathi, V., Foster, K., Beard, M., and Binz, T. (2020). Engineering an Effective Human SNAP-23 Cleaving Botulinum Neurotoxin A Variant. *Toxins* *12*, 804.
- Silva, M.C., and Haggarty, S.J. (2020). Human pluripotent stem cell-derived models and drug screening in CNS precision medicine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1471*, 18–56.
- Silva, J., Barrandon, O., Nichols, J., Kawaguchi, J., Theunissen, T.W., and Smith, A. (2008). Promotion of Reprogramming to Ground State Pluripotency by Signal Inhibition. *PLoS Biol.* *6*, e253.
- Simpson, L.L. (2004). IDENTIFICATION OF THE MAJOR STEPS IN BOTULINUM TOXIN ACTION. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *44*, 167–193.
- Singh, B.R., and Kukreja, R. (2015). The botulinum toxin as a therapeutic agent: molecular and pharmacological insights. *Res. Rep. Biochem.* *173*.
- Sive, H.L., Draper, B.W., Harland, R.M., and Weintraub, H. (1990). Identification of a retinoic acid-sensitive period during primary axis formation in *Xenopus laevis*. *Genes Dev.* *4*, 932–942.
- Slater, C. (2017). The Structure of Human Neuromuscular Junctions: Some Unanswered Molecular Questions. *Int. J. Mol. Sci.* *18*, 2183.

- Slater, C.R. (2015). The functional organization of motor nerve terminals. *Prog. Neurobiol.* *134*, 55–103.
- Slaughaupt, S.A. (2003). Rescue of a human mRNA splicing defect by the plant cytokinin kinetin. *Hum. Mol. Genet.* *13*, 429–436.
- Sloop, R.R., Cole, B.A., and Escutin, R.O. (1997). Human response to botulinum toxin injection: Type B compared with type A. *Neurology* *49*, 189–194.
- Smith, J.R., Vallier, L., Lupo, G., Alexander, M., Harris, W.A., and Pedersen, R.A. (2008). Inhibition of Activin/Nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm. *Dev. Biol.* *313*, 107–117.
- Smith, T.J., Lou, J., Geren, I.N., Forsyth, C.M., Tsai, R., LaPorte, S.L., Tepp, W.H., Bradshaw, M., Johnson, E.A., Smith, L.A., et al. (2005). Sequence Variation within Botulinum Neurotoxin Serotypes Impacts Antibody Binding and Neutralization. *Infect. Immun.* *73*, 5450–5457.
- Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G.W., Cook, E.G., Hargus, G., Blak, A., Cooper, O., Mitalipova, M., et al. (2009). Parkinson's Disease Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells Free of Viral Reprogramming Factors. *Cell* *136*, 964–977.
- Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., and Rothman, J.E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* *362*, 318–324.
- Sommer, E.W., Sommer, H., and Meyer, K.F. (1926). The Purification of Botulinum Toxin. *J. Infect. Dis.* *39*, 345–345.
- Soscia, D.A., Lam, D., Tooker, A.C., Enright, H.A., Triplett, M., Karande, P., Peters, S.K.G., Sales, A.P., Wheeler, E.K., and Fischer, N.O. (2020). A flexible 3-dimensional microelectrode array for *in vitro* brain models. *Lab. Chip* *20*, 901–911.
- Spira, M.E., and Hai, A. (2013). Multi-electrode array technologies for neuroscience and cardiology. *Nat. Nanotechnol.* *8*, 83–94.
- Srikanth, P., and Young-Pearse, T.L. (2014). Stem Cells on the Brain: Modeling Neurodevelopmental and Neurodegenerative Diseases Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *J. Neurogenet.* *28*, 5–29.
- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008). Induced Pluripotent Stem Cells Generated Without Viral Integration. *Science* *322*, 945–949.
- Stahl, A.M., Ruthel, G., Torres-Melendez, E., Kenny, T.A., Panchal, R.G., and Bavari, S. (2007). Primary Cultures of Embryonic Chicken Neurons for Sensitive Cell-Based Assay of Botulinum Neurotoxin: Implications for Therapeutic Discovery. *J. Biomol. Screen.* *12*, 370–377.
- Steinbeck, J.A., Choi, S.J., Mrejeru, A., Ganat, Y., Deisseroth, K., Sulzer, D., Mosharov, E.V., and Studer, L. (2015). Optogenetics enables functional analysis of human embryonic stem cell-derived grafts in a Parkinson's disease model. *Nat. Biotechnol.* *33*, 204–209.

- Steinbeck, J.A., Jaiswal, M.K., Calder, E.L., Kishinevsky, S., Weishaupt, A., Toyka, K.V., Goldstein, P.A., and Studer, L. (2016). Functional Connectivity under Optogenetic Control Allows Modeling of Human Neuromuscular Disease. *Cell Stem Cell* *18*, 134–143.
- Stenmark, P., Dong, M., Dupuy, J., Chapman, E.R., and Stevens, R.C. (2010). Crystal Structure of the Botulinum Neurotoxin Type G Binding Domain: Insight into Cell Surface Binding. *J. Mol. Biol.* *397*, 1287–1297.
- Stern, Skiba, M., Dorner, M., Dorner, B., and von Berg (2018). Replacing the mouse bioassay for diagnostics and potency testing of botulinum neurotoxins – progress and challenges. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr.* .-..
- Stock, R., Jeckel, P., Kraushaar, U., Wüst, R., Fallgatter, A., and Volkmer, H. (2021). The potential of induced pluripotent stem cells for discriminating neurodevelopmental disorders. *STEM CELLS Transl. Med.* *10*, 50–56.
- Strelchenko, N., Verlinsky, O., Kukhareno, V., and Verlinsky, Y. (2004). Morula-derived human embryonic stem cells. *Reprod. Biomed. Online* *9*, 623–629.
- Strotmeier, J., Willjes, G., Binz, T., and Rummel, A. (2012). Human synaptotagmin-II is not a high affinity receptor for botulinum neurotoxin B and G: Increased therapeutic dosage and immunogenicity. *FEBS Lett.* *586*, 310–313.
- Sturgill, E.R., Aoki, K., Lopez, P.H., Colacurcio, D., Vajn, K., Lorenzini, I., Majić, S., Yang, W.H., Heffer, M., Tiemeyer, M., et al. (2012). Biosynthesis of the major brain gangliosides GD1a and GT1b. *Glycobiology* *22*, 1289–1301.
- Südhof, T.C. (2013). A molecular machine for neurotransmitter release: synaptotagmin and beyond. *Nat. Med.* *19*, 1227–1231.
- Südhof, T.C., and Rizo, J. (2011). Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*.
- Sullivan, S., Stacey, G.N., Akazawa, C., Aoyama, N., Baptista, R., Bedford, P., Bennaceur Griscelli, A., Chandra, A., Elwood, N., Girard, M., et al. (2018). Quality control guidelines for clinical-grade human induced pluripotent stem cell lines. *Regen. Med.* *13*, 859–866.
- Sun, N., Panetta, N.J., Gupta, D.M., Wilson, K.D., Lee, A., Jia, F., Hu, S., Cherry, A.M., Robbins, R.C., Longaker, M.T., et al. (2009). Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 15720–15725.
- Sutton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R., and Brunger, A.T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* *395*, 347–353.
- Swartz, E.W., Shintani, G., Wan, J., Maffei, J.S., Wang, S.H., Miller, B.L., Havton, L.A., and Coppola, G. (2020). Establishment of a Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neuromuscular Co-Culture Under Optogenetic Control (Neuroscience).
- Szent-Györgyi, A.G. (1975). Calcium regulation of muscle contraction. *Biophys. J.* *15*, 707–723.

T

Taapken, S.M., Nisler, B.S., Newton, M.A., Sampsell-Barron, T.L., Leonhard, K.A., McIntire, E.M., and Montgomery, K.D. (2011). Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* *29*, 313–314.

Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2001). Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr. Biol.* *11*, 1553–1558.

Taga, A., Dastgheyb, R., Habela, C., Joseph, J., Richard, J., Gross, S.K., Lauria, G., Lee, G., Haughey, N., and Maragakis, N.J. (2019). Role of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Spinal Cord Astrocytes in the Functional Maturation of Motor Neurons in a Multielectrode Array System. *STEM CELLS Transl. Med.* *8*, 1272–1285.

Takahashi, J. (2019). Preparing for first human trial of induced pluripotent stem cell-derived cells for Parkinson's disease: an interview with Jun Takahashi. *Regen. Med.* *14*, 93–95.

Takahashi, J. (2020). iPS cell-based therapy for Parkinson's disease: A Kyoto trial. *Regen. Ther.* *13*, 18–22.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* *126*, 663–676.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* *131*, 861–872.

Talbot, J., and Maves, L. (2016). Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease: Muscle fiber type: Development and disease. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* *5*, 518–534.

Tan, G.C., Mazzoni, E.O., and Wichterle, H. (2016). Iterative Role of Notch Signaling in Spinal Motor Neuron Diversification. *Cell Rep.* *16*, 907–916.

Tannenbaum, S.E., Tako Turetsky, T., Singer, O., Aizenman, E., Kirshberg, S., Ilouz, N., Gil, Y., Berman-Zaken, Y., Perlman, T.S., Geva, N., et al. (2012). Derivation of Xeno-Free and GMP-Grade Human Embryonic Stem Cells – Platforms for Future Clinical Applications. *PLoS ONE* *7*, e35325.

Tao, L., Peng, L., Berntsson, R.P.-A., Liu, S.M., Park, S., Yu, F., Boone, C., Palan, S., Beard, M., Chabrier, P.-E., et al. (2017). Engineered botulinum neurotoxin B with improved efficacy for targeting human receptors. *Nat. Commun.* *8*.

Tétreault, P., Dansereau, M.-A., Doré-Savard, L., Beaudet, N., and Sarret, P. (2011). Weight bearing evaluation in inflammatory, neuropathic and cancer chronic pain in freely moving rats. *Physiol. Behav.* *104*, 495–502.

Thirunavukkarasu, N., Johnson, E., Pillai, S., Hodge, D., Stanker, L., Wentz, T., Singh, B., Venkateswaran, K., McNutt, P., Adler, M., et al. (2018). Botulinum Neurotoxin Detection Methods for Public Health Response and Surveillance. *Front. Bioeng. Biotechnol.* *6*.

- Thomas Jr, C., Springer, P., Loeb, G., Berwaldnetter, Y., and Okun, L. (1972). A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells. *Exp. Cell Res.* *74*, 61–66.
- Thomson, J.A. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* *282*, 1145–1147.
- Thuan, N.V., Kishigami, S., and Wakayama, T. (2010). How to Improve the Success Rate of Mouse Cloning Technology. *J. Reprod. Dev.* *56*, 20–30.
- Tian, J., Yan, Y., Xi, W., Zhou, R., Lou, H., Duan, S., Chen, J.F., and Zhang, B. (2018). Optogenetic Stimulation of GABAergic Neurons in the Globus Pallidus Produces Hyperkinesia. *Front. Behav. Neurosci.* *12*.
- Tian, L., Akerboom, J., Schreiter, E.R., and Looger, L.L. (2012). Neural activity imaging with genetically encoded calcium indicators. In *Progress in Brain Research*, (Elsevier), pp. 79–94.
- Tiberi, L., Vanderhaeghen, P., and van den Aemele, J. (2012). Cortical neurogenesis and morphogens: diversity of cues, sources and functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* *24*, 269–276.
- Tighe, A.P., and Schiavo, G. (2013). Botulinum neurotoxins: Mechanism of action. *Toxicon* *67*, 87–93.
- Tintignac, L.A., Brenner, H.-R., and Rüegg, M.A. (2015). Mechanisms Regulating Neuromuscular Junction Development and Function and Causes of Muscle Wasting. *Physiol. Rev.* *95*, 809–852.
- Tomassy, G.S., Lodato, S., Traves-Gibson, Z., and Arlotta, P. (2010). Development and Regeneration of Projection Neuron Subtypes of the Cerebral Cortex. *Sci. Prog.* *93*, 151–169.
- Trevar, J.W. (1927). The error of determination of toxicity. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Contain. Pap. Biol. Character* *101*, 483–514.
- Tsien, R.Y. (1980). New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry* *19*, 2396–2404.
- Tsubooka, N., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. (2009). Roles of Sall4 in the generation of pluripotent stem cells from blastocysts and fibroblasts. *Genes Cells* *14*, 683–694.
- Tsukamoto, K., Kohda, T., Mukamoto, M., Takeuchi, K., Ihara, H., Saito, M., and Kozaki, S. (2005). Binding of *Clostridium botulinum* Type C and D Neurotoxins to Ganglioside and Phospholipid: *NOVEL INSIGHTS INTO THE RECEPTOR FOR CLOSTRIDIAL NEUROTOXINS*. *J. Biol. Chem.* *280*, 35164–35171.

U

- Ullian, E., Harris, B., Wu, A., Chan, J., and Barres, B. (2004). Schwann cells and astrocytes induce synapse formation by spinal motor neurons in culture. *Mol. Cell. Neurosci.* *25*, 241–251.

Umehara, Y., Toyama, S., Tominaga, M., Matsuda, H., Takahashi, N., Kamata, Y., Niyonsaba, F., Ogawa, H., and Takamori, K. (2020). Robust induction of neural crest cells to derive peripheral sensory neurons from human induced pluripotent stem cells. *Sci. Rep.* *10*.

Urbach, A., Bar-Nur, O., Daley, G.Q., and Benvenisty, N. (2010). Differential Modeling of Fragile X Syndrome by Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* *6*, 407–411.

V

Vallier, L. (2005). Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J. Cell Sci.* *118*, 4495–4509.

Van Pham, P., Phan, N.L.-C., Vu, N.B., Truong, N.H., and Phan, N.K. (2016). New Trends in Clinical Applications of Induced Pluripotent Stem Cells. In *Stem Cell Processing*, P.V. Pham, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 77–98.

Vandecasteele, M., Senova, Y.-S., Palfi, S., and Dugué, G.P. (2015). Potentiel thérapeutique de la neuromodulation optogénétique. *Médecine/Sciences* *31*, 404–416.

Varrault, A., Journot, L., and Bouschet, T. (2019). Cerebral Cortex Generated from Pluripotent Stem Cells to Model Corticogenesis and Rebuild Cortical Circuits: In Vitro Veritas? *Stem Cells Dev.* *28*, 361–369.

Vaskova, E.A., Stekleneva, A.E., Medvedev, S.P., and Zakian, S.M. (2013). “Epigenetic memory” phenomenon in induced pluripotent stem cells. *Acta Naturae* *5*, 15–21.

Vazin, T., Becker, K.G., Chen, J., Spivak, C.E., Lupica, C.R., Zhang, Y., Worden, L., and Freed, W.J. (2009). A Novel Combination of Factors, Termed SPIE, which Promotes Dopaminergic Neuron Differentiation from Human Embryonic Stem Cells. *PLoS ONE* *4*, e6606.

Vila, O.F., Uzel, S.G.M., Ma, S.P., Williams, D., Pak, J., Kamm, R.D., and Vunjak-Novakovic, G. (2019). Quantification of human neuromuscular function through optogenetics. *Theranostics* *9*, 1232–1246.

van Vliet, E.A., Aronica, E., and Gorter, J.A. (2014). Role of blood–brain barrier in temporal lobe epilepsy and pharmacoresistance. *Neuroscience* *277*, 455–473.

van der Wal, E., Herrero-Hernandez, P., Wan, R., Broeders, M., in 't Groen, S.L.M., van Gestel, T.J.M., van IJcken, W.F.J., Cheung, T.H., van der Ploeg, A.T., Schaaf, G.J., et al. (2018). Large-Scale Expansion of Human iPSC-Derived Skeletal Muscle Cells for Disease Modeling and Cell-Based Therapeutic Strategies. *Stem Cell Rep.* *10*, 1975–1990.

W

Walker, M.C., and Kullmann, D.M. (2020). Optogenetic and chemogenetic therapies for epilepsy. *Neuropharmacology* *168*, 107751.

- Wang, J., Casals-Diaz, L., Zurawski, T., Meng, J., Moriarty, O., Nealon, J., Edupuganti, O.P., and Dolly, O. (2017). A novel therapeutic with two SNAP-25 inactivating proteases shows long-lasting anti-hyperalgesic activity in a rat model of neuropathic pain. *Neuropharmacology* *118*, 223–232.
- Wang, Q., Zhang, B., Xiong, W.-C., and Mei, L. (2006). MuSK Signaling at the Neuromuscular Junction. *J. Mol. Neurosci.* *30*, 223–226.
- Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J.B., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Muguruma, K., et al. (2007). A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* *25*, 681–686.
- Wataya, T., Ando, S., Muguruma, K., Ikeda, H., Watanabe, K., Eiraku, M., Kawada, M., Takahashi, J., Hashimoto, N., and Sasai, Y. (2008). Minimization of exogenous signals in ES cell culture induces rostral hypothalamic differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 11796–11801.
- Weitz, A.C., Behrend, M.R., Lee, N.S., Klein, R.L., Chiodo, V.A., Hauswirth, W.W., Humayun, M.S., Weiland, J.D., and Chow, R.H. (2013). Imaging the response of the retina to electrical stimulation with genetically encoded calcium indicators. *J. Neurophysiol.* *109*, 1979–1988.
- Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., and Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* *448*, 318–324.
- Whitcup, S.M. (2019). The History of Botulinum Toxins in Medicine: A Thousand Year Journey. In *Botulinum Toxin Therapy*, S.M. Whitcup, and M. Hallett, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 3–10.
- Whitemarsh, R.C.M., Strathman, M.J., Chase, L.G., Stankewicz, C., Tepp, W.H., Johnson, E.A., and Pellett, S. (2012). Novel Application of Human Neurons Derived from Induced Pluripotent Stem Cells for Highly Sensitive Botulinum Neurotoxin Detection. *Toxicol. Sci.* *126*, 426–435.
- Whitemarsh, R.C.M., Tepp, W.H., Bradshaw, M., Lin, G., Pier, C.L., Scherf, J.M., Johnson, E.A., and Pellett, S. (2013). Characterization of Botulinum Neurotoxin A Subtypes 1 Through 5 by Investigation of Activities in Mice, in Neuronal Cell Cultures, and In Vitro. *Infect. Immun.* *81*, 3894–3902.
- Whitworth, K.M., and Prather, R.S. (2010). Somatic cell nuclear transfer efficiency: How can it be improved through nuclear remodeling and reprogramming?: SOMATIC CELL NUCLEAR TRANSFER EFFICIENCY. *Mol. Reprod. Dev.* *77*, 1001–1015.
- Wilder-Kofie, T.D., Lúquez, C., Adler, M., Dykes, J.K., Coleman, J.D., and Maslanka, S.E. (2011). An alternative in vivo method to refine the mouse bioassay for botulinum toxin detection. *Comp. Med.* *61*, 235–242.
- Williams, L.A., Davis-Dusenbery, B.N., and Eggan, K.C. (2012). SnapShot: Directed Differentiation of Pluripotent Stem Cells. *Cell* *149*, 1174–1174.e1.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H.S. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* *385*, 810–813.

Wilmut, I., Bai, Y., and Taylor, J. (2015). Somatic cell nuclear transfer: origins, the present position and future opportunities. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *370*, 20140366.

Wobus, A.M., and Boheler, K.R. (2005). Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy. *Physiol. Rev.* *85*, 635–678.

Wood, S.J., and R. Slater, C. (2001). Safety factor at the neuromuscular junction. *Prog. Neurobiol.* *64*, 393–429.

Woudstra, C., Skarin, H., Anniballi, F., Fenicia, L., Bano, L., Drigo, I., Koene, M., Båyon-Auboyer, M.-H., Buffereau, J.-P., De Medici, D., et al. (2012). Neurotoxin Gene Profiling of Clostridium botulinum Types C and D Native to Different Countries within Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* *78*, 3120–3127.

X

Xie, Z., Yang, Q., Song, D., Quan, Z., and Qing, H. (2020). Optogenetic manipulation of astrocytes from synapses to neuronal networks: A potential therapeutic strategy for neurodegenerative diseases. *Glia* *68*, 215–226.

Xiong, C., Chua, K.C., Stage, T.B., Priotti, J., Kim, J., Altman-Merino, A., Chan, D., Saraf, K., Canato Ferracini, A., Fattahi, F., et al. (2020). Human Induced Pluripotent Stem Cell Derived Sensory Neurons are Sensitive to the Neurotoxic Effects of Paclitaxel. *Clin. Transl. Sci.*

Xu, Q., Guo, L., Moore, H., Waclaw, R.R., Campbell, K., and Anderson, S.A. (2010). Sonic Hedgehog Signaling Confers Ventral Telencephalic Progenitors with Distinct Cortical Interneuron Fates. *Neuron* *65*, 328–340.

Y

Yadirgi, G., Stickings, P., Rajagopal, S., Liu, Y., and Sesardic, D. (2017). Immuno-detection of cleaved SNAP-25 from differentiated mouse embryonic stem cells provides a sensitive assay for determination of botulinum A toxin and antitoxin potency. *J. Immunol. Methods* *451*, 90–99.

Yamamoto, H., Ida, T., Tsutsuki, H., Mori, M., Matsumoto, T., Kohda, T., Mukamoto, M., Goshima, N., Kozaki, S., and Ihara, H. (2012). Specificity of botulinum protease for human VAMP family proteins: Specificity of botulinum protease. *Microbiol. Immunol.* *56*, 245–253.

Yamanaka, S. (2020). Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy—Promise and Challenges. *Cell Stem Cell* *27*, 523–531.

Yao, G., Lam, K., Perry, K., Weisemann, J., Rummel, A., and Jin, R. (2017). Crystal Structure of the Receptor-Binding Domain of Botulinum Neurotoxin Type HA, Also Known as Type FA or H. *Toxins* *9*, 93.

Yowler, B.C., Kensinger, R.D., and Schengrund, C.-L. (2002). Botulinum Neurotoxin A Activity Is Dependent upon the Presence of Specific Gangliosides in Neuroblastoma Cells Expressing Synaptotagmin I. *J. Biol. Chem.* *277*, 32815–32819.

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* *318*, 1917–1920.

Yu, R.K., Tsai, Y.-T., Ariga, T., and Yanagisawa, M. (2011). Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides--an overview. *J. Oleo Sci.* *60*, 537–544.

Z

Zanetti, G., Sikorra, S., Rummel, A., Krez, N., Duregotti, E., Negro, S., Henke, T., Rossetto, O., Binz, T., and Pirazzini, M. (2017). Botulinum neurotoxin C mutants reveal different effects of syntaxin or SNAP-25 proteolysis on neuromuscular transmission. *PLOS Pathog.* *13*, e1006567.

Zanetti, G., Negro, S., Pirazzini, M., and Caccin, P. (2018). Mouse Phrenic Nerve Hemidiaphragm Assay (MPN). *BIO-Protoc.* *8*.

Zeng, H., Guo, M., Martins-Taylor, K., Wang, X., Zhang, Z., Park, J.W., Zhan, S., Kronenberg, M.S., Lichtler, A., Liu, H.-X., et al. (2010). Specification of Region-Specific Neurons Including Forebrain Glutamatergic Neurons from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS ONE* *5*, e11853.

Zhai, Y., Chen, X., Yu, D., Li, T., Cui, J., Wang, G., Hu, J.-F., and Li, W. (2015). Histone deacetylase inhibitor valproic acid promotes the induction of pluripotency in mouse fibroblasts by suppressing reprogramming-induced senescence stress. *Exp. Cell Res.* *337*, 61–67.

Zhang, H., and Cohen, A.E. (2017). Optogenetic Approaches to Drug Discovery in Neuroscience and Beyond. *Trends Biotechnol.* *35*, 625–639.

Zhang, H.L., and Peng, H.B. (2011). Mechanism of Acetylcholine Receptor Cluster Formation Induced by DC Electric Field. *PLoS ONE* *6*, e26805.

Zhang, P., Wu, X., Hu, C., Wang, P., and Li, X. (2012). Rho kinase inhibitor Y-27632 and Accutase dramatically increase mouse embryonic stem cell derivation. *Vitro Cell. Dev. Biol. - Anim.* *48*, 30–36.

Zhang, S., Masuyer, G., Zhang, J., Shen, Y., Lundin, D., Henriksson, L., Miyashita, S.-I., Martínez-Carranza, M., Dong, M., and Stenmark, P. (2017). Identification and characterization of a novel botulinum neurotoxin. *Nat. Commun.* *8*.

Zhang, S.-C., Wernig, M., Duncan, I.D., Brüstle, O., and Thomson, J.A. (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* *19*, 1129–1133.

Zhao, W., Ji, X., Zhang, F., Li, L., and Ma, L. (2012). Embryonic Stem Cell Markers. *Molecules* *17*, 6196–6236.

Zhao, Y., Yin, X., Qin, H., Zhu, F., Liu, H., Yang, W., Zhang, Q., Xiang, C., Hou, P., Song, Z., et al. (2008). Two Supporting Factors Greatly Improve the Efficiency of Human iPSC Generation. *Cell Stem Cell* *3*, 475–479.

Zhong, C., and Schleifenbaum, J. (2019). Genetically Encoded Calcium Indicators: A New Tool in Renal Hypertension Research. *Front. Med.* *6*.

Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., et al. (2009). Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins. *Cell Stem Cell* *4*, 381–384.

Zong, Y., and Jin, R. (2013). Structural mechanisms of the agrin–LRP4–MuSK signaling pathway in neuromuscular junction differentiation. *Cell. Mol. Life Sci.* *70*, 3077–3088.

Zurn, A.D., Winkel, L., Menoud, A., Djabali, K., and Aebischer, P. (1996). Combined effects of GDNF, BDNF, and CNTF on motoneuron differentiation in vitro. *J. Neurosci. Res.* *44*, 133–141.

Titre : Modélisation fonctionnelle de la synapse intégrant cellules souches pluripotentes humaines et optogénétique : Application à l'étude des neurotoxines botuliques

Mots clés : Neurotoxines botuliques, Cellules souches pluripotentes induites humaines, Systèmes synaptiques, Fonctionnalité, Optogénétique, Imagerie calcique

Résumé : Les neurotoxines botuliques (BoNT), produites par une bactérie du genre *Clostridium botulinum*, sont des endoprotéases inhibant le relargage de neurotransmetteurs au niveau de la jonction neuromusculaire (JNM) ce qui aboutit à une paralysie flasque musculaire fatale, connue sous le nom de botulisme. Bien que les BoNT soient extrêmement toxiques (dose létale estimée chez l'Homme : 0,1-1 ng/Kg en intraveineuse et 1 µg/Kg par voie orale) et responsables du botulisme, leur forte affinité pour les neurones moteurs combinée à leur utilisation à des concentrations adaptées en ont fait des médicaments extrêmement précieux pour des indications à la fois thérapeutiques et esthétiques, allant ainsi du traitement des troubles neuromusculaires à la réduction des rides du visage. Depuis leur première utilisation, le nombre d'indications pour ces molécules est en constante hausse. Les connaissances accrues sur le mécanisme d'action des BoNT combinées à l'émergence de plateforme de production recombinante offrent la possibilité de modifier les BoNT à façon, et de conférer à ces molécules de nouveaux potentiels thérapeutiques. Cependant, ces développements nécessitent l'implémentation de tests cellulaires fonctionnels robustes, permettant de récapituler les différentes étapes du mécanisme d'action des BoNT. Dans ce contexte, mon projet de thèse a évalué la possibilité de combiner les cellules souches pluripotentes induites (CSPi) humaines avec les technologies optiques telles que l'optogénétique et l'imagerie calcique, pour mettre en place deux systèmes synaptiques humains fonctionnels : un modèle de synapse neuromusculaire et un modèle de synapse cortico-corticale. Ces modèles fonctionnels ont permis d'étudier l'effet de différents variants de BoNT et de comparer leur efficacité dans un contexte physiologique humains. De tels systèmes *in vitro* représentent un atout majeur pour améliorer la valeur translationnelle des données précliniques sur les BoNT.

Title : Functional modeling of the synapse integrating human pluripotent stem cells and optogenetics: Application to the study of botulinum neurotoxins.

Keywords : Botulinum neurotoxins, Human induced pluripotent stem cells, Synaptic systems, Function, Optogenetics, Calcium imaging

Abstract : Botulinum neurotoxins (BoNTs), produced by a bacterium *Clostridium botulinum*, are among the most toxic substances known. By inhibiting neurotransmitter release at the neuromuscular junction (NMJ), exposure to these neurotoxins results in the fatal flaccid muscular paralysis called botulism. Due to neurotoxins' high potency (lethal dose in Humans: 0.1-1 ng/Kg in intravenous and 1 µg/Kg orally), they became valuable drugs for therapeutic and aesthetic applications, ranging from the treatment of neuromuscular disorders to the reduction of facial wrinkles. Since their first use, the number of indications for these molecules has been steadily increasing over the past decade. A better understanding of their mechanisms of action combined with the emergence of platforms for custom recombinant BoNTs development start to offer new perspectives in term of therapeutic applications. However, such developments are dependent of functional cell-based assays to accurately and robustly evaluate the potential of these neurotoxins. By combining human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) with optical technologies such as optogenetics and calcium imaging, my thesis project aimed at establishing two functional human synaptic systems: humanized models for neuromuscular synapse and cortical-cortical synapse. These functional models allowed to study the effect of different variants of BoNTs and to compare their potency in a human physiological context. Such *in vitro* systems represent a major asset to improve the translational value of preclinical BoNTs data.