



**HAL**  
open science

# Utilisation des cellules souches pluripotentes humaines pour avancer dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques associés à l’Amyotrophie Spinale Infantile

Camille Januel

► **To cite this version:**

Camille Januel. Utilisation des cellules souches pluripotentes humaines pour avancer dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques associés à l’Amyotrophie Spinale Infantile. Sciences du Vivant [q-bio]. Paris Saclay University, 2022. Français. NNT : 2020UPASA001 . tel-04583393

**HAL Id: tel-04583393**

**<https://theses.hal.science/tel-04583393v1>**

Submitted on 22 May 2024

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

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

Utilisation des cellules souches pluripotentes  
humaines pour avancer dans la  
compréhension des mécanismes  
physiopathologiques associés à  
l’Amyotrophie Spinale Infantile

*Using human pluripotent stem cells derived motoneurons to address  
the pathogenesis of Spinal Muscular Atrophy*

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay**

**École doctorale n°569**

Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)

Spécialité de doctorat : Physiologie / Physiopathologie

Unité de recherche : Inserm, I-STEM, 91100 Corbeil-Essonnes, France

Référent : Université d'Évry Val d'Essonne

Thèse présentée et soutenue publiquement à Évry, le 15 mars 2022, par

**Camille Januel**

**Composition du Jury :**

<b>Dr. Suzie Lefebvre</b> Université Paris Descartes, Inserm U1124 – Paris	Rapporteur
<b>Dr. Laure Stochlic</b> Institut de Myologie – Paris	Rapporteur
<b>Pr. Claire Legay</b> Université Paris Descartes, SPPIN, CNRS UMR 8003 – Paris	Examinatrice
<b>Dr. Stéphane Nedelec</b> Institut du fer à Moulin – Paris	Examineur
<b>Pr. Christelle Monville</b> UEVE/Inserm U861, I-STEM – Evry	Examinatrice
<b>Dr. Cécile Martinat</b> UEVE/Inserm U861, I-STEM – Evry	Directrice de thèse

**Titre : Utilisation des cellules souches pluripotentes humaines pour avancer dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques associés à l’Amyotrophie Spinale Infantile**

**Mots clés :** Amyotrophie spinale infantile, Cellules souches pluripotentes humaines, Motoneurones spinaux et crâniens, Jonction neuromusculaire

**Résumé :** L'amyotrophie spinale infantile (SMA) est l'une des formes de maladie génétique les plus courantes chez l'enfant. La SMA se caractérise par une quantité insuffisante de protéine SMN (survival motor neuron), due à des mutations du gène *SMN1*, induisant la dégénérescence des neurones moteurs, la faiblesse et l'atrophie des muscles squelettiques. Au cours de la dernière décennie, trois traitements augmentant les niveaux de protéines SMN ont été mis sur le marché. Malgré des résultats remarquables, différentes études soulignent la nécessité de développer des stratégies thérapeutiques supplémentaires, et indépendantes de SMN, pour fournir des soins optimaux à tous les patients atteints de SMA. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques devrait permettre d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la SMA. Les modèles de criblage *in vitro* fonctionnels sont manquants dans le domaine de la SMA. Ainsi, le premier objectif de mon projet était d'évaluer le potentiel d'un nouveau modèle humain de co-culture SMA, associant des motoneurones dérivés de cellules souches pluripotentes humaines et des cellules musculaires primaires humaines, pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Ce système intercellulaire reproduit la mort spécifique des motoneurones spinaux SMA, mais aussi les défauts synaptiques présents avant la mort cellulaire spécifique. Basé sur une cible agnostique, ce système nous a permis d'identifier le potentiel des inhibiteurs JNK et GSK-3 pour normaliser les phénotypes cellulaires associés à la SMA, et indépendamment de SMN. D'autre part, alors que les motoneurones spinaux sont vulnérables, d'autres groupes de motoneurones, y compris les motoneurones crâniens, qui innervent les muscles du visage et des yeux, sont épargnés dans la SMA pour des raisons inconnues. Dans ce contexte, le second objectif de ma thèse était de mieux comprendre comment la perte d'une protéine ubiquitaire peut induire la dégénérescence d'un sous-type cellulaire spécifique, dans le but d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques. Pour cela, nous avons généré des populations homogènes de motoneurones spinaux et crâniens dérivés de hiPSC dont l'expression de SMN est diminuée. Alors que la survie des motoneurones spinaux SMA ainsi que leur connectivité avec la cible musculaire sont affectées, les motoneurones crâniens SMA sont retrouvés épargnés. L'activation de voies de signalisation apoptotiques a été spécifiquement observée dans les motoneurones spinaux SMA. Par une approche transcriptomique, nous avons identifié une dérégulation spécifique dans les motoneurones spinaux SMA de gènes impliqués dans la plasticité synaptique, pouvant affecter l'intégrité de la jonction neuromusculaire. Dans l'ensemble, nos résultats démontrent la possibilité de reproduire *in vitro* la vulnérabilité sélective associée à la SMA et devraient faciliter l'identification de nouvelles approches thérapeutiques.

**Title: Using human pluripotent stem cells derived motoneurons to address the pathogenesis of Spinal Muscular Atrophy**

**Keywords:** Spinal muscular atrophy, Human induced pluripotent stem cells, Spinal and Cranial motoneurons, Neuromuscular junction

**Abstract:** Spinal muscular atrophy is one of the most common genetic forms of motoneuron diseases in childhood. Due to mutations in the *SMN1* gene, SMA is characterized by an insufficient amount of SMN (survival motor neuron) protein, resulting in denervation, skeletal muscle atrophy and death. In the last decade, three treatments increasing SMN protein levels have been approved by the US Food and Drug Administration and result in significant benefits for the patients. Despite these remarkable results, it is appreciated that these SMN dependent drugs will have to be supported by additional non-SMN therapeutic interventions to provide optimal care to all SMA patients. Hence, a better comprehension of the pathogenic mechanisms should help to identify new therapeutic strategies for SMA. However, predictive and functional SMA in vitro models for drug screening are still lacking. In this context, the first aim of my project was to develop a human SMA cellular model, based on the coculture of human pluripotent stem cells derived motoneurons and micropatterned human primary skeletal muscle cells, adaptable to screening format in 384 well plates. These intercellular systems reproduced the specific death of SMA spinal motoneurons but also the pre-synaptic defects that appeared before this specific cell death. To evaluate the suitability of these intercellular systems for drug screening, we developed a target-agnostic based drug screening revealing the potential of JNK3 and GSK-3 inhibitors to normalize the cellular phenotypes associated to SMA independently of SMN expression. While spinal motoneurons are highly vulnerable, some motor neuron groups, including cranial motoneurons, which innervate the face and eye muscles, are for unknown reasons spared. In this context, the second objective of my thesis was to better understand the mechanisms underlying this selective vulnerability to determine how the loss of a ubiquitously expressed protein can induce degeneration in a select cell type and consequently to determine new therapeutic pathways. We generated homogenous populations of spinal and cranial motoneurons derived from SMA hiPSC that both harbored a decreased SMN expression. However, SMA hiPSC-derived cranial motoneurons were found to be spared whereas SMA hiPSC-derived spinal motoneurons exhibited a defective connectivity to their muscular targets as well as a decreased survival. Comparative transcriptional analysis between resistant and vulnerable SMA motoneurons revealed the potential contribution of genes involved in neurotransmission and neurite outgrowth that may aid in the maintenance of a functional neuromuscular synapse and thus contribute to the selective resistance of certain motor neurons in SMA. Altogether, our results described the possibility to capture in vitro the selective vulnerability associated with SMA and should facilitate the identification of new therapeutic targets toward preserving vulnerable motoneurons.

## REMERCIEMENTS

---

Je tiens à remercier en premier lieu les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail de doctorat, le Dr. Suzie Lefebvre et le Dr. Laure Stochlic pour leur contribution en tant que rapporteurs, le Pr. Claire Legay, le Dr. Stéphane Nedelec et le Pr. Christelle Monville qui ont également jugé ces travaux en tant qu'examineurs. Je tiens à remercier particulièrement Stéphane pour avoir suivi ce projet tout au long de ma thèse et pour ses conseils avisés.

Je remercie également l'école doctorale "Innovation Thérapeutique du fondamental à l'appliqué" qui m'a permis de bénéficier d'une allocation de recherche doctorale sans laquelle je n'aurais pu réaliser l'ensemble de mes travaux de thèse.

J'adresse mes sincères remerciements au Dr. Cécile Martinat. Tout d'abord, merci de m'avoir accueillie dans l'équipe lors de mon stage de Master 2 et de m'avoir ensuite donné l'opportunité de poursuivre ce travail, qui me tenait à cœur, en thèse. Je te remercie pour ta confiance et de m'avoir permis de travailler sur différents projets, dont certains en collaborations, et tous très passionnants. Merci également pour ton soutien lors des différentes préparations : le concours de l'école doctorale, les PhD meeting et sans oublier les différentes présentations en congrès. Enfin, un grand merci pour ton aide et la correction de ce manuscrit de thèse. Merci pour ces quatre ans !

Je tiens également à remercier Marc Peschanski et Raymond Zakhia pour m'avoir accueillie au sein de l'institut I-STEM, et de m'avoir permis d'évoluer dans un environnement scientifique de qualité.

Je remercie toutes les personnes qui ont contribué aux avancées de ce projet de recherche. Merci tout d'abord au Pr. Ruben Artero, au Dr. Piotr Konieczny, au Dr. Marina Boido et à Giovanna Menduti sans qui je n'aurais pu travailler sur le projet de repositionnement de molécules. Merci également au Dr. Vincent Mouly pour nous avoir fourni les différentes lignées de cellules musculaires.

Les résultats que j'ai pu obtenir au cours de ces différents projets n'auraient pu voir le jour sans l'aide précieuse des différentes plateformes d'I-STEM. Je souhaite ainsi remercier la plateforme bioproduction et plus particulièrement Léa et Lise pour leur aide dans la génération des motoneurons à partir des bioréacteurs, on y sera arrivé mais pas sans difficulté ! Merci également à Margot, Hélène et Alexandre pour le temps qu'ils ont consacré aux analyses transcriptomiques. Merci à Jérôme et Céline pour leurs précieux conseils pour les différentes analyses de microscopie. Je remercie également Johanna et à nouveau Alexandre pour votre aide au milieu de tous ces robots.

Je remercie, bien sûr, toutes les personnes de l'équipe « maladies du Motoneurone ». La *team* thésards d'abord : Julie, Antoine et Juliette, merci pour votre accueil et votre bonne humeur quand je suis arrivée en stage, merci de m'avoir donné l'exemple pour poursuivre en thèse. Julie, mon binôme des co-cultures ! Je te remercie particulièrement d'avoir été là tout au long de cette thèse, et même après ton départ à Milan. Merci de m'avoir aussi bien formé sur les différentes techniques. Merci pour toutes nos longues discussions de commères, de

nos vies ou parfois scientifiques (oui ça pouvait arriver). Merci pour ta patience, et d'avoir toujours été là pour m'écouter dans les moments de doutes. Sandrine, merci pour ta bienveillance et tes conseils avisés tout au long de ces 4 ans qui ont énormément participé à l'avancer de ce projet. Jackie, merci pour ces soirées où tu as attendu que j'ai terminé pour pouvoir me ramener jusqu'à Juvisy. Tu manques beaucoup à l'équipe, je n'aurais d'autre mot que bats-toi ! Florine, nous sommes arrivées ensemble à I-STEM, nous voilà 4 ans plus tard, merci d'avoir toujours été là pour me soutenir et m'aider. Adeline, tu ne fais plus partie de l'équipe Motoneurone depuis quelques mois mais rien n'a changé alors je te remercie pour tous les « petits services » que tu as pu me rendre, on ne les comptera pas sinon je ne vais plus pouvoir remercier personnes. Azania et Judith, je vous remercie pour votre bonne ambiance dans l'équipe ! Enfin, merci l'équipe Motoneurone pour votre enthousiasme et votre bonne humeur, qui ont contribué à la très bonne ambiance du secteur 7, et ont rendu mon quotidien toujours agréable même dans les moments un peu plus difficiles de ces 4 années de thèse, ne changez rien !

Je souhaite également remercier tous les membres d'I-STEM que j'ai pu côtoyer de près ou de loin au cours de cette aventure. Merci à l'équipe Wolfram, Sandra et Axel pour votre gentillesse et la bonne ambiance que vous avez toujours su mettre dans le secteur 7. Emmanuelle, Margot, Elise, Marie, Elie, Alexandre et Pauline, merci pour toutes nos discussions pendant les repas ou le temps d'un café. Jean-Baptiste, merci pour tes conseils et ton aide précieuse lors de mes questionnements sur « l'après-thèse ». Pascal et Michel, merci pour votre humour même si je ne le comprends pas toujours...

Un merci tout particulier à Louise et Manon, mes copines d'escalade ! Louise, venir à I-STEM n'a plus tout à fait la même saveur depuis que tu es partie pour une nouvelle aventure en Hollande. Merci à toutes les deux pour toutes nos discussions et moments passés à I-STEM et surtout à la salle d'escalade. Bravo Manon pour ta première rouge ! J'attends avec impatience la première blanche maintenant.

Merci également à tous mes amis, qui ont toujours répondu présents au cours de ces dernières années. Merci Julie, Sarah C., et Laurène, nous avons grandi ensemble et on avance encore ensemble aujourd'hui, alors merci d'être toujours là pour moi ! Cindy, Mariane, Tess et Justine, merci de m'avoir toujours encouragé et je mesure la chance de vous avoir rencontré sur les bancs de l'ENS. Merci aussi à Sarah F., Johan, Claire, Alexis, Thomas et Clémence, pour tous les bons moments passés ensemble à Paris.

Pour finir, je tiens à remercier toute ma famille : merci à ma grand-mère Odette et mon grand-père Bob pour leur gentillesse et leur tendresse. Merci à mes parents et mes frères pour leur confiance et leur soutien. Papa et Maman, merci de m'avoir écouté en me faisant croire que vous compreniez ce que je faisais au labo, merci d'être toujours là pour moi. Thomas et Théo, merci pour votre énorme enthousiasme et votre bonne humeur à toute épreuve. Enfin, un grand merci à Quentin de m'avoir soutenu et aidé tout au long de ces années de thèse. Merci pour tout.

\* \* \*

*« Il ne faut avoir aucun regret pour le passé, aucun remords pour le présent, et  
une confiance inébranlable pour l'avenir. »*

Jean Jaurès

\* \* \*

# TABLE DES MATIERES

---

<b>Index des figures .....</b>	<b>10</b>
<b>Index des tableaux .....</b>	<b>12</b>
<b>Abréviations .....</b>	<b>13</b>
<b>Avant-Propos .....</b>	<b>15</b>
<b>Introduction</b>	
<b>Chapitre I : L'amyotrophie spinale infantile .....</b>	<b>18</b>
1. Découverte de la SMA .....	18
2. Symptômes et formes associés .....	20
2.1. SMA de type I : forme infantile sévère (maladie de Werdnig-Hoffmann) .....	21
2.2. SMA de type II : forme infantile intermédiaire.....	22
2.3. SMA de type III : forme juvénile (maladie de Kugelberg-Welander) .....	23
2.4. Formes rares de SMA : type 0 et type IV .....	23
3. Les atteintes cellulaires de la SMA .....	24
3.1. Atteintes du système nerveux central .....	24
3.2. Atteintes musculaires .....	25
3.3. Autres atteintes .....	27
4. Bases génétiques et moléculaires des défauts associés .....	29
4.1. Le locus SMA .....	29
4.2. Les gènes SMN1 et SMN2 .....	31
4.3. Mécanismes d'épissages alternatif de SMN2 .....	32
4.4. Les gènes modificateurs de la SMA .....	34
5. Structures et fonctions de la protéine SMN .....	37
5.1. Structure de la protéine SMN.....	37
5.2. Expression de la protéine SMN en fonction du temps .....	39
5.3. Localisation cellulaire de la protéine SMN .....	40
5.4. Fonctions de la protéine SMN .....	40
6. Modèles d'étude de la SMA .....	46
6.1. Modèles animaux de la SMA .....	46
6.2. Modèles cellulaires de la SMA .....	52
7. Stratégies thérapeutiques de la SMA .....	52
7.1. Stratégies dépendantes de SMN .....	53
7.2. Stratégies indépendantes de SMN .....	57
7.3. Challenges et perspectives .....	61



**Chapitre II : Les atteintes de la jonction neuromusculaire dans la SMA ..... 62**

- 1. La jonction neuromusculaire..... 62
- 2. Développement et maturation de la jonction neuromusculaire ..... 64
  - 2.1. Étapes de la formation de la jonction neuromusculaire ..... 64
  - 2.2. Composants moléculaires du développement et de la maturation de la NMJ...66
- 3. Transmission synaptique au niveau de la jonction neuromusculaire ..... 69
- 4. Altération de la jonction neuromusculaire dans la SMA ..... 71
  - 4.1. Implication de SMN dans le développement de la jonction neuromusculaire 71
  - 4.2. Le paradigme des motoneurons comme cible primaire de la SMA..... 72
  - 4.3. Vulnérabilité sélective des MN spinaux et leur connectivité avec la cible musculaire ..... 77

**Chapitre III : Les cellules souches pluripotentes humaines..... 80**

- 1. Obtention des cellules souches pluripotentes humaines ..... 80
  - 1.1. Les cellules souches embryonnaires humaines ..... 80
  - 1.2. Les cellules souches induites à la pluripotence ..... 82
- 2. Culture des cellules souches pluripotentes humaines ..... 86
  - 2.1. Maintien de la pluripotence des hPSC..... 86
  - 2.2. Contrôle qualité de la pluripotence et de l'intégrité génomique des hPSC .... 88
  - 2.3. Le potentiel de différenciation ..... 89
- 3. Applications biomédicales des cellules souches pluripotentes humaines ..... 92
  - 3.1. La thérapie cellulaire ..... 92
  - 3.2. Modélisation pathologique in vitro : la course au développement ..... 94
  - 3.3. La découverte de nouveaux médicaments..... 96
- 4. Utilisation des hPSC pour la modélisation de maladies neuromusculaires ..... 97
  - 4.1. Obtention des cellules d'intérêt de la jonction neuromusculaire ..... 97
  - 4.2. Modélisation in vitro de la jonction neuromusculaire humaine ..... 102
  - 4.3. Modélisation pathologique de la SMA et identification de médicaments candidats in vitro ..... 106

**Travaux de Recherche**

**Problématique & Démarche expérimentale ..... 111**

**Résultats ..... 113**

Article 1 : Inhibition of JNK and GSK3 signaling pathway promotes spinal motor neurons survival and muscle improvement in human in vitro SMA co-culture system ..... 113

Article 2 : Human stem cell-derived cranial and spinal motor neurons reveal transcriptional mechanisms between resistant and sensitive motor neurons in SMA..160

<u>Article 3</u> : «Moxifloxacin rescues SMA phenotypes in animal and patient-derived cell models.» .....	196
<b>Discussion Générale</b> .....	<b>227</b>
1. Potentiel des hPSC pour reproduire et mieux comprendre la sensibilité différentielle des motoneurones dans les maladies neuromusculaires .....	229
2. Sensibilité différentielle des motoneurones et de leur connectivité avec la fibre musculaire dans la SMA .....	234
3. Identification de nouvelles pistes thérapeutiques pour la SMA .....	239
<b>Conclusions &amp; Perspectives</b> .....	<b>244</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>247</b>
<b>Annexe</b> .....	<b>295</b>

# INDEX DES FIGURES

---

## Chapitre I : L'amyotrophie spinale infantile

Figure 1 : Chronologie de la classification de l'amyotrophie spinale (SMA) depuis sa découverte clinique .....	19
Figure 2 : Schéma représentant l'expression des gènes SMN (survival motor neuron) chez les individus sains et atteints de SMA .....	20
Figure 3 : Formes cliniques de la SMA selon les classifications et leurs corrélations avec le nombre de copies de SMN2. SMA .....	24
Figure 4 : Gènes du locus SMA et description des gènes SMN .....	31
Figure 5 : Modèles de régulation de l'épissage de l'exon 7 des gènes SMN1 et SMN2.....	33
Figure 6 : Défaut de production de la protéine SMN chez les patients SMA.....	34
Figure 7 : Influence du nombre de copies du gène SMN2 sur la sévérité clinique de la SMA	35
Figure 8 : Description schématique des domaines de la protéine SMN .....	38
Figure 9 : Localisation cellulaire de la protéine SMN .....	40
Figure 10 : Fonctions cellulaires générales de la protéine SMN dans les motoneurones.....	41
Figure 11 : Implication de SMN dans l'assemblage des snRNP et dans l'épissage alternatif..	42
Figure 12 : Principaux complexes moléculaires dans lesquels SMN est impliquée .....	43
Figure 13 : Aperçu schématique des altérations de la dynamique du cytosquelette et de l'endocytose observées suite à un déficit en SMN .....	44
Figure 14 : modèle de voies de signalisation dans lesquels SMN est impliquée dans la régulation de l'apoptose .....	46
Figure 15 : Homologie de séquence de la protéine SMN.....	47
Figure 16 : Stratégies thérapeutiques actuelles pour la SMA .....	53
Figure 17 : Traitement dépendant de SMN approuvées par la FDA pour la SMA.....	54
Figure 18 : Schéma des principales cibles thérapeutiques indépendantes de SMN.....	58

## Chapitre II : Les atteintes de la jonction neuromusculaire dans la SMA

Figure 19 : Les maladies neuromusculaires, un large groupe avec des troubles différents ...	62
Figure 20 : Structure de la jonction neuromusculaire humaine .....	63
Figure 21 : Représentation schématique de la lame basale synaptique et de ses principaux composants.....	64
Figure 22 : Les différentes étapes du développement de la NMJ chez la souris .....	65
Figure 23 : Caractéristiques musculaires, neuronales et synaptiques de la jonction neuromusculaire mature .....	66
Figure 24 : Activation du complexe Musk-Lrp4-Agrin.....	67
Figure 25 : Représentation schématique du récepteur à l'acétylcholine (AChR) .....	68
Figure 26 : Voie de signalisation Wnt dans la formation de la NMJ .....	69
Figure 27 : Schéma des composants impliqués dans le fonctionnement de la NMJ .....	69
Figure 28 : Processus d'exocytose et cycle des vésicules synaptiques .....	70
Figure 29 : Bases de la transmission neuromusculaire .....	71
Figure 30 : Développement de la NMJ et corrélation avec l'expression de SMN chez la souris.	72
Figure 31 : Schémas représentant l'altération de la NMJ dans la SMA .....	74
Figure 32 : Échantillons de NMJ postnataux issues de patients contrôles et SMA de type I..	75
Figure 33 : Architecture de la NMJ de quadriceps chez les souris contrôle et SMA à P10 .....	75

Figure 34 : Le saut d'exon de l'agrine Z entraîne une diminution drastique des niveaux d'ARNm et de protéines de l'agrine Z + dans les SMA MN .....	76
Figure 35 : L'analyse de la jonction neuromusculaire révèle une vulnérabilité différentielle entre les muscles crâniens et abdominaux.....	78
Figure 36 : Les protéines des neurofilaments s'accumulent de manière pré-synaptique dans les muscles lombaires, mais pas dans les muscles extra-oculaires ou de la langue chez les souris SMND7 SMA.....	78

### **Chapitre III : Les cellules souches pluripotentes humaines**

Figure 37 : L'embryogénèse, l'origine des cellules hES.....	81
Figure 38 : Schéma représentant la plasticité du devenir cellulaire .....	83
Figure 39 : La reprogrammation par transfert nucléaire .....	83
Figure 40 : La reprogrammation par fusion cellulaire.....	84
Figure 41 : La reprogrammation par induction.....	84
Figure 42 : Les méthodes de reprogrammation des cellules somatiques suivant la balance sécurité/efficacité .....	85
Figure 43 : Voie de signalisation permettant le maintien de la pluripotence ou la différenciation des PSC .....	87
Figure 44 : Caractérisation de colonies d'hiPSC <i>in vitro</i> .....	89
Figure 45 : Différenciation ciblée des cellules souches pluripotentes.....	90
Figure 46 : Différenciation induite par facteurs de croissance et petites molécules.....	91
Figure 47 : Application des cellules souches pluripotentes .....	93
Figure 48 : Tendances mondiales des essais cliniques impliquant des cellules souches pluripotentes .....	94
Figure 49 : L'ingénierie synergique pour surmonter les limites des organoïdes et des organ-on-chips.....	95
Figure 50 : Utilisation des hiPSC dans la recherche de nouveaux composés thérapeutiques	96
Figure 51 : Étapes du développement des MN humains reproduit <i>in vitro</i> par l'ajout de petites molécules et de protéines recombinantes de signalisation.....	99
Figure 52 : La différenciation myogénique à partir de CSPh.....	101
Figure 53 : Hétérogénéité des jonctions neuromusculaires chez les mammifères .....	104
Figure 54 : Résumé des principales découvertes faite grâce à l'utilisation des hPSC SMA...	108

### **Discussion générale**

Figure 55 : Modélisation pathologique de la Dystrophie Myotonique de type 1 (DM1) en co-culture sur support micropatterné .....	230
Figure 56 : Les motoneurones dérivés de hiPSC SMA montrent un défaut d'épissage de XBP1 .....	236
Figure 57 : Les méthodes de criblage (DS) et de repositionnement de composés (DR) comme approches dans la recherche thérapeutique pour la SMA .....	240
Figure 58 : Effet du composé GT5 en combinaison avec la moxifloxacine sur la survie des motoneurones SMA.....	242

## INDEX DES TABLEAUX

---

### **Chapitre I : L'amyotrophie spinale infantile**

Tableau 1 : Classification des différentes formes d'amyotrophies spinales proximales.....	22
Tableau 2 : Résumé des atteintes multi-systémiques observées chez les patients et les modèles animaux SMA.....	29
Tableau 3 : Les composants du complexe SMN.....	39
Tableau 4 : Modèles murins de la SMA.....	48
Tableau 5 : Modèles murins pharmacologiques de SMA.....	49
Tableau 6 : Stratégies thérapeutiques de la SMA au stade de l'essai clinique .....	56
Tableau 7 : Comparaison des trois thérapies SMA actuellement disponibles.....	57

### **Chapitre II : Les atteintes de la jonction neuromusculaire dans la SMA**

Tableau 8 : Modèle murins développés pour étudier la perte des MNs dans la SMA .....	73
--	----

### **Chapitre III : Les cellules souches pluripotentes humaines**

Tableau 9 : Différenciation induite par les petites molécules .....	92
Tableau 10 : Découverte de médicaments basé sur l'utilisation des hiPSC.....	97
Tableau 11 : Résumé des protocoles de différenciation de motoneurons à partir de cellules souches humaines induites à la pluripotence .....	100
Tableau 12 : Résumé des protocoles de différenciation de cellules musculaires à partir des hPSC .....	102
Tableau 13 : Modèles de NMJ <i>in vitro</i> humain (cellules musculaires squelettiques et motoneurons humains) .....	105

### **Discussion générale**

Tableau 14 : Coûts moyens et médians nécessaires pour la recherche et le développement de nouveaux composés thérapeutiques par domaine thérapeutique.....	238
Tableau 15 : Liste des composés repositionnés découverts pour le traitement de la SMA .	241

## ABREVIATIONS

---

<b>ARN:</b> acide ribonucléique	<b>GLT1:</b> glutamate transporter 1
<b>ARNm:</b> acide ribonucléique messenger	<b>GRIN1:</b> Glutamate Receptor Ionotropic N-Methyl D-Aspartate de type 1
<b>ADN:</b> acide désoxyribonucléique	<b>GSK3:</b> glycogen synthase kinase 3
<b>AAV:</b> adéno-associated virus	<b>HB9:</b> homeobox gene 9
<b>ACh:</b> Acétylcholine	<b>HDACi:</b> histone deacetylase inhibitor
<b>AChE:</b> Acétylcholine estérase	<b>hESC:</b> human embryonic stem cells
<b>AChR:</b> Acétylcholine receptor	<b>hiPSC:</b> human induced pluripotent stem cells
<b>ADNc:</b> acide désoxyribonucléique complémentaire	<b>hnRNP :</b> heterogenous ribonucleoprotein particle
<b>AGRN :</b> agrine	<b>HTS:</b> High-throughput screening
<b>AINS:</b> anti-inflammatoire non stéroïdien	<b>IGF1 :</b> insulin-like growth factor 1
<b>ALS :</b> amyotrophic lateral sclerosis	<b>INSR:</b> insulin receptor
<b>AMPc :</b> Adénosine monophosphate cyclique	<b>ISL1/2:</b> ISL LIM homeobox 1/2
<b>AMPK :</b> AMP-activated protein kinase	<b>JNK:</b> c-Jun N-terminal kinases
<b>AON/ASO:</b> oligonucleotide anti-sens	<b>Klf4:</b> Kruppel-like factor 4
<b>ATP:</b> adenosine triphosphate	<b>Lrp4:</b> LDL receptor related protein
<b>α-BTX :</b> alpha-bungarotoxine	<b>MAPK:</b> Mitogen-activated protein kinases
<b>BDNF:</b> Brain-derived neurotrophic factor	<b>MBNL:</b> muscleblind
<b>BHE:</b> barrière hemato-encéphalique	<b>MCI:</b> masse cellulaire interne
<b>BMP :</b> Bone Morphogenetic Protein	<b>MEF:</b> mouse embryonic fibroblast
<b>Cas9:</b> CRISPR associated protein 9	<b>mEPP:</b> miniature end plate potential
<b>CB :</b> Cajal bodies	<b>MN:</b> motoneurone
<b>CD56:</b> cluster de differentiation 56	<b>mSC:</b> Cellule de Schwann myélinisante
<b>CHAT:</b> choline acetyltransferase	<b>MSCs :</b> Mesenchymal stem cells
<b>CMAP:</b> compound muscle action potential	<b>mTOR:</b> mammalian target of rapamycin
<b>CMS:</b> Congenital myasthenic syndrom	<b>MuSK:</b> muscle specific kinase
<b>CNTF:</b> ciliary neurotrophic factor	<b>MYHC:</b> myosin heavy chain
<b>hPSC :</b> cellules souches pluripotentes humaines	<b>MyoG:</b> myogénine
<b>COLQ:</b> Collagène Q	<b>NCAM (CD56):</b> Neural cell adhesion molecule
<b>DM1 :</b> Dystrophie myotonique type 1	<b>NGF:</b> Nerve growth factor
<b>DMSO:</b> diméthylsulfoxyde	<b>NGN1/2:</b> Neurogénine 1/2
<b>DNAse:</b> désoxyribonucléase	<b>NMDs:</b> neuromuscular diseases
<b>Dok7:</b> Docking protein 7	<b>NMJ:</b> neuromuscular junction
<b>DPI:</b> diagnostic pré-implantatoire	<b>NRG:</b> Neuréguline
<b>DRG:</b> Dorsal root ganglion	<b>Oct3/4:</b> Octamer-binding transcription factor4
<b>EB:</b> embryoid bodies	<b>OLIG2:</b> Oligodendrocyte factor 2
<b>EC:</b> excitation-contraction coupling	<b>PAM:</b> Protospacer adjacent motif
<b>EDTA:</b> acide éthylènediaminetétraacétique	<b>Phox2B :</b> Paired-like homeobox 2b
<b>EMA :</b> European Medicines Agency	<b>PKC :</b> Protein Kinase C
<b>EMG:</b> électromyogramme	<b>PMO:</b> Phosphorodiamidate morpholino oligomers
<b>EPP:</b> end plate potential (ou ppm: potentiel de plaque motrice)	<b>Ppm:</b> potentiel de plaque motrice
<b>ERK:</b> Extracellular signal-regulated kinases	<b>Ppmm :</b> potentiel de plaque motrice miniature
<b>ES:</b> embryonic stem	<b>qPCR :</b> quantitative polymerase chain reaction
<b>ESC:</b> embryonic stem cells	<b>RA :</b> retinoic acid
<b>FDA:</b> food drug administration	<b>RBPs:</b> RNA binding proteins
<b>FGF:</b> fibroblast growth factor	<b>RyR1:</b> Ryanodine receptor 1
<b>FIV:</b> fécondation in vitro	
<b>GDNF:</b> Glial cell-derived neurotrophic factor	

**SC**: cellule de Schwann  
**SHH**: Sonic Hedgehog  
**shRNA**: short hairpin RNA  
**siRNA** : Small interfering RNA  
**SMA**: spinal muscular atrophy  
**SMN1**: survival of motor neuron 1  
**SNC**: système nerveux central  
**SNP**: système nerveux périphérique  
**snRNP**: small nuclear ribonucléoprotéine  
**Sox2**: sex determining region Y-box 2  
**SSEA3**: Stage specific embryonic antigen 3  
**SV2**: synaptic vesicle type 2  
**TDP43**: TAR DNA binding protein 43  
**TGF-β**: Transforming growth factor bêta  
**TNT**: Troponin T  
**tSC** : Cellules de Schwann terminales  
**UTR**: Untranslated region  
**VDCC**: Voltage-gated calcium channel  
**Wnt** : Wingless-type MMTV integration site family member  
**ZNF9**: Zinc Finger 9

## AVANT-PROPOS

---

L'amyotrophie spinale infantile (ou SMA), liée au gène *SMN1*, est une maladie d'origine génétique rare. On estime entre 80 et 120 le nombre d'enfants atteints de SMA qui naîtraient chaque année en France. Cette anomalie génétique provoque la réduction des taux de protéine SMN, induisant la dégénérescence des neurones moteurs, la faiblesse et l'atrophie musculaire. Elle peut être diagnostiquée dès la naissance ou dans les tout premiers mois de vie, dans la petite enfance ou plus rarement à l'adolescence voire à l'âge adulte. En fonction de l'âge d'apparition des premiers symptômes et du niveau moteur maximal atteint, les médecins distinguent 4 types de SMA. Il y a à peine quelques années, aucun traitement n'était disponible, seuls des soins et des médicaments symptomatiques étaient proposés aux patients. Depuis les cinq dernières années, trois traitements innovants, visant tous à augmenter le niveau de protéine SMN, ont été développés et mis sur le marché. Alors que ces traitements ont considérablement changé le domaine de la SMA, certaines limites ont cependant été mises en évidence, soulignant la nécessité d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Dans le domaine de la SMA, la recherche a longtemps reposé sur l'utilisation de modèles animaux et plus particulièrement les modèles murins SMA. En effet, les types cellulaires affectés, tels que les motoneurons et la jonction neuromusculaire, sont très difficiles d'accès chez le patient. Cependant, l'avènement des cellules souches pluripotentes a révolutionné le monde scientifique grâce à ces nombreuses applications : la modélisation pathologique, l'identification de nouveaux médicaments et la thérapie cellulaire. C'est dans ce contexte que j'ai commencé à m'intéresser à l'utilisation des cellules souches pluripotentes humaines à des fins de modélisation pathologique pour la SMA, lors de mon stage de Master 1 en 2017, au sein de l'équipe du Professeur Kevin Talbot à Oxford (Nuffield department of clinical neurosciences). Afin de poursuivre dans ce domaine, j'ai pu rejoindre l'institut I-STEM (Institut des cellules Souches pour le Traitement et l'Etude des maladies Monogéniques), pour mon stage de Master 2, au sein de l'équipe « Maladie du motoneurone » dirigée par le Dr. Cécile Martinat. Cette équipe s'intéresse particulièrement à deux pathologies différentes : la Dystrophie Myotonique de type 1 (DM1) et la SMA. Dans le but d'avancer dans la compréhension des mécanismes physiopathologique associés à la SMA, j'ai pu évaluer au cours de ce stage l'intérêt d'utiliser des motoneurons spinaux dérivés de cellules souches humaines induites à la pluripotence et portant la mutation causale de la SMA pour reproduire certains phénotypes associés à cette pathologie. Cette preuve de concept m'a donné par la suite l'envie de poursuivre ces travaux en tant qu'étudiante en thèse au sein de l'équipe.

L'objectif de ma thèse consistait dans un premier temps à évaluer la possibilité de reproduire et d'étudier les mécanismes impliqués dans la sensibilité différentielle des motoneurons. Phénomène qui est observée à la fois chez des patients et dans des modèles animaux de la SMA. A partir d'un protocole développé précédemment dans l'équipe, la



première étape a été de générer les cellules d'intérêt, à savoir les motoneurones spinaux et craniaux à partir des hiPSC de patients SMA et contrôle. Le deuxième objectif a consisté à évaluer les atteintes en termes de connectivité entre les motoneurones spinaux et leur cible musculaire. Ce programme a été développé en collaboration avec une autre doctorante de l'équipe, Julie Tahraoui, dont le travail portait sur le développement d'un modèle de jonction neuromusculaire dans le cadre de la DM1. Ce travail, s'inscrivait dans un projet ANR en collaboration avec les équipes du Pr. Claire Legay (Université Paris Descartes, Paris), du Pr. Laurent Schaeffer (INMG, Lyon) et l'entreprise CYTOO (Grenoble), visait à produire un nouveau modèle *in vitro* de la jonction neuromusculaire humaine, adapté à l'identification de nouveaux biomarqueurs et au criblage à haut débit pour les maladies neuromusculaires. Le dernier objectif de mon doctorat a découlé directement de mon projet sur les interactions motoneurones et cellules musculaires. Ce projet a consisté à évaluer la possibilité d'identifier des composés potentiellement thérapeutiques pour la SMA. C'est dans le cadre de ce projet que j'ai pu travailler en collaboration avec les équipes du Pr. Ruben Artero (Université de Valence, Espagne) et du Dr. Marina Boido (Université de Turin, Italie) sur la validation de composés déjà sur le marché et qui avaient été identifiés préalablement comme capable d'augmenter l'inclusion de l'exon 7 de *SMN2* dans un modèle de drosophile. Ce travail a abouti au dépôt d'un brevet (EP-08658) pour l'un des composés identifiés.

L'ensemble de mon doctorat m'a offert l'opportunité d'appréhender l'utilisation des cellules souches pluripotentes humaines à des fins de modélisation pathologique, au développement de nouveaux outils biotechnologiques, et enfin, d'évaluer la pertinence de ces modèles pour l'identification et la validation de nouvelles cibles thérapeutiques. Dans l'optique de poursuivre mon parcours professionnel dans le monde de la recherche, et plus particulièrement dans le domaine des cellules souches pluripotentes humaines et leurs applications, j'ai pour projet de rejoindre la société américaine Neurona Therapeutics, à San Francisco.

# INTRODUCTION

---

## Chapitre I : L'amyotrophie spinale infantile

L'amyotrophie spinale, ou plus communément appelée Spinal Muscular Atrophy (SMA) en anglais, correspond à un groupe de maladies neuromusculaires d'origine génétique qui se caractérisent par des atteintes musculaires, telles que la faiblesse et l'atrophie musculaire, ainsi que la destruction des neurones moteurs de la moelle épinière. Ce terme regroupe une variété de pathologies qui se distinguent les unes des autres par l'âge d'apparition des premiers signes, la répartition des muscles touchés ou encore le mode de transmission génétique. Les amyotrophies spinales sont ainsi classifiées en trois groupes selon la topographie des muscles atteints : i) les amyotrophies spinales proximales qui se caractérisent par une atteinte des muscles des épaules, des bras, des hanches et des cuisses (c'est-à-dire les muscles proches du tronc cérébral) ; ii) les amyotrophies spinales distales dans lesquelles la faiblesse musculaire prédomine sur les muscles des mains, des avant-bras, des pieds et des jambes ; iii) les amyotrophies bulbo-spinales caractérisées par une atteinte des muscles bulbaires et qui se manifestent cliniquement par des difficultés d'articulation et de déglutition. De nos jours, l'utilisation du terme « SMA », sans autre précision, renvoie le plus souvent à la forme la plus fréquente : l'amyotrophie spinale proximale. Dans la suite de cette thèse, nous nous concentrerons uniquement sur l'étude de cette forme d'amyotrophie spinale. Parmi les amyotrophies spinales proximales, on distingue 4 types : l'amyotrophie spinale infantile sévère (SMA de type I) ; l'amyotrophie spinale infantile intermédiaire (SMA de type II) ; l'amyotrophie spinale juvénile (SMA de type III) et l'amyotrophie spinale de type IV.

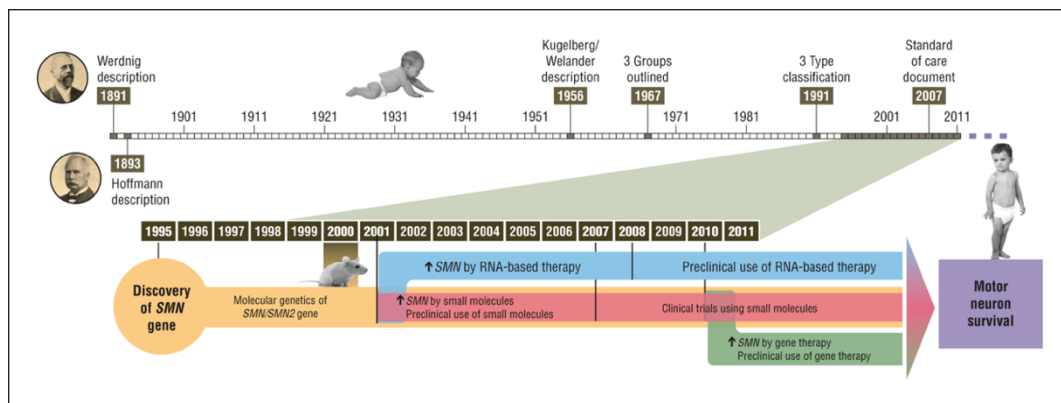
Depuis l'identification de la cause génétique sous-jacente en 1995 jusqu'à l'identification de thérapeutiques, 25 ans après et dont trois sont aujourd'hui mis sur le marché, il est remarquable de voir la vitesse à laquelle le domaine de la SMA a progressé. Ces nouvelles thérapies représentent une grande réussite pour les patients mais représentent aussi, d'une certaine manière, le début d'une nouvelle ère qui devra faire face à de nouveaux défis.

### 1. Découverte de la SMA

Les premières descriptions de cette pathologie ont été réalisées en 1881 par le neurologue autrichien Guido Werdnig qui décrit 2 frères présentant un début de faiblesse musculaire vers 10 mois et qui décédèrent à trois et six ans. À l'autopsie, il a constaté une dégénérescence des cellules de la corne antérieure de la moelle. Entre 1893 et 1900, le pédiatre allemand Johann Hoffmann décrit 7 nouveaux cas. Ces premières descriptions correspondaient à des formes particulièrement sévères débutants dès la naissance (Hoffmann, 1893; Werdnig, 1891) (**Figure 1**). Suite à l'observation de lésions dégénératives des motoneurones à l'autopsie, le Dr. Hoffmann établit l'origine médullaire de la maladie et y rattacha également son nom (Hoffmann, 1893). Ce n'est que plus tard, dans les années 1950, que deux médecins suédois, Erik Kugelberg et Lisa Welander, rapportèrent des formes de SMA moins sévères apparaissant au cours de l'adolescence ou à l'âge adulte (Brandt, 1950;

Kugelberg and Welander, 1956; Wohlfart et al., 1955).

Cliniquement, l'ensemble de ces formes aboutit à une atteinte motrice proximale, symétrique et affectant de façon variable mais toujours ascendante le patient (les membres inférieurs sont plus atteints que les membres supérieurs). Anatomiquement, ces différentes formes se caractérisent par la dégénérescence spécifique des motoneurones  $\alpha$  de la corne antérieure ventrale de la moelle épinière (**Figure 2**). Cette dégénérescence s'associe à une atrophie des muscles proximaux (tronc, hanche et épaules) conduisant, en premier lieu, à une faiblesse des membres inférieurs. Une paralysie progressive se développe dans un second temps, atteignant le diaphragme et les muscles du tronc dont la paralysie mène, dans une majorité des cas, au décès par insuffisance respiratoire (Markowitz et al., 2012). En revanche, cette dégénérescence est spécifique aux motoneurones spinaux car les neurones sensitifs, présents dans la corne postérieure dorsale de la moelle épinière, ne sont pas atteints. De plus, les patients ne présentent aucune altération des fonctions cognitives (Rivière, 2007; von Gontard et al., 2002).



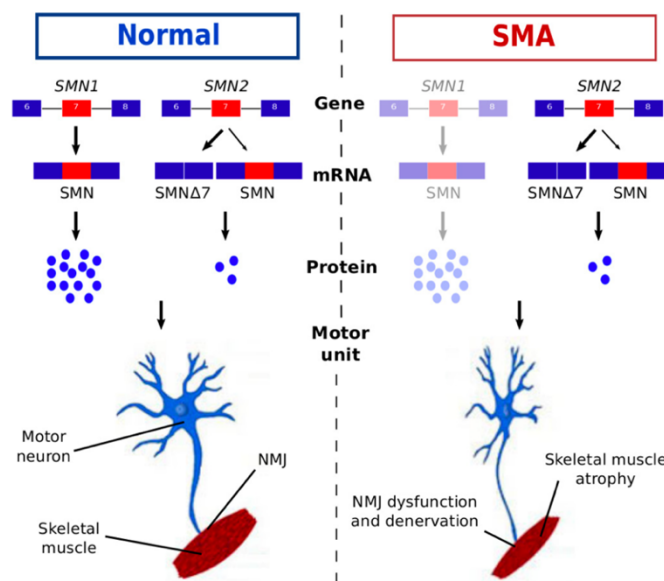
**Figure 1 : Chronologie de la classification de l'amyotrophie spinale (SMA) depuis sa découverte clinique (Kolb and Kissel, 2011).**

En 1950, la première étude approfondie portant sur la description de plusieurs cas de SMA sévère a permis au danois, Sven Brandt, d'affirmer le caractère autosomique récessif et la grande hétérogénéité clinique de la maladie en examinant 112 patients issus de 69 familles (Brandt, 1950). Une vingtaine d'années plus tard, Pearn confirma l'implication d'un gène autosomique récessif dans tous les cas familiaux de SMA (Pearn et al., 1973). Cependant, il ne trouva aucune explication au fait que différents degrés de sévérité soient retrouvés au sein d'une même fratrie.

En 1990, deux études portant sur la cartographie des génomes de 28 familles de patients atteints par des formes variables de la SMA, ont permis de mettre en évidence un marqueur génétique porté par le bras long du chromosome 5 : le locus 5q11.2-13.3 (Brzustowicz et al., 1990; Gilliam et al., 1990; Melki et al., 1990). Ces études ont apporté la preuve d'une origine génétique commune dans plus de 90% des cas de SMA. La caractérisation approfondie de cette séquence a permis d'identifier, 5 ans plus tard, un gène anormalement transcrit dans 95 à 98% des patients atteints de la SMA, appelé *SMN* (Survival Motor Neuron) (Lefebvre et al., 1995). Ce gène est présent sous deux isoformes, l'une télomérique, appelée

*SMN1*, et l'autre centromérique, *SMN2*. Des analyses réalisées sur des patients atteints de SMA ont révélé une diminution significative de la transcription du gène *SMN1* en protéine SMN pleine longueur ou « *full length* » ( $SMN^{FL}$ ) (Lefebvre et al., 1995). Dans 94% des cas, le patient présente une délétion homozygote du gène *SMN1* au niveau chromosomique et dans les 6% restants, le patient est porteur de mutations entraînant un défaut de production de l'ARNm et donc de la protéine  $SMN^{FL}$  en raison d'un décalage du cadre de lecture ou de l'apparition de mutations non-sens (Ogino and Wilson, 2004). D'autre part, dans près de 2% des cas, l'apparition de délétions *de novo* dans le gène *SMN1* serait responsable d'une certaine instabilité chromosomique (Wirth et al., 1997).

Des études épidémiologiques ont montré que cette maladie génétique, avec une incidence de 1 naissance sur 10000, était jusqu'à très récemment l'une des causes les plus fréquentes de mortalité infantile, affectant sans distinction les hommes et les femmes (Lunn and Wang, 2008; Ogino and Wilson, 2002; Pearn, 1978). Ce taux d'incidence élevé peut être expliqué par un nombre important de porteurs sains, hétérozygotes, qui varie cependant en fonction de leur origine ethnique. La fréquence retrouvée dans la population caucasienne (1/47) est supérieure à celle retrouvée dans la population afro-américaine (1/72) (Feng et al., 2017; Hendrickson et al., 2009; MacDonald et al., 2014; Sugarman et al., 2012).



**Figure 2 : Schéma représentant l'expression des gènes *SMN* (survival motor neuron) chez les individus sains et atteints de SMA.** Le gène télomérique *SMN1* produit 100% de protéine SMN pleine longueur ( $SMN^{FL}$ ), tandis que le gène centromérique *SMN2* produit environ 10 % de protéine  $SMN^{FL}$  et 90 % de protéine SMN tronquée ( $SMN\Delta7$ ) en raison d'un épissage incorrect. Chez les individus sains, les deux gènes SMN sont présents. Chez les patients atteints de SMA, l'absence du gène *SMN1*, due à des mutations ponctuelles ou délétions, aboutit à l'absence de production de protéine  $SMN^{FL}$ . Dans ce cas, seule la contribution du gène *SMN2* est responsable du niveau de la protéine SMN. Adapté de (Chong et al., 2021).

## 2. Symptômes et formes associés

L'hétérogénéité de l'âge d'apparition des premiers symptômes, du degré de l'atteinte

musculaire et de l'évolution des capacités motrices rendaient difficile le diagnostic et la prise en charge des patients. Dans un but de simplification, une première classification en trois types a été proposée en 1991 (Munsat, 1991). La SMA de type I est associée à une forme sévère, le type II à une forme intermédiaire et le type III à une forme juvénile. Des modifications ultérieures ont finalement été apportées avec l'ajout de deux autres formes : le type 0, pour les cas prénataux ; et le type IV, dont l'apparition des symptômes arrivent à l'âge l'adulte (Kolb and Kissel, 2015; Russman, 2007) (**Tableau 1**). Cependant, il existe des degrés de sévérité différent au sein d'une même forme et environ 25 % des patients échappent à une classification précise. Bien que de nombreuses études aient démontré une relation inverse entre le nombre de copies de *SMN2* et la sévérité de la maladie, cette corrélation n'est cependant pas toujours exacte (Brkušnin et al., 2015; Fang et al., 2015; Lefebvre et al., 1997; Stabley et al., 2021, 2015; van der Steege et al., 1995). Par exemple, il existe des cas de patients SMA de type II et III qui ne présentent que deux copies de *SMN2* au lieu des trois ou quatre copies théoriques (Bernal et al., 2010; Vezain et al., 2010). Ainsi, des chevauchements entre les types de SMA sont couramment observés. De plus, comme la valeur prédictive d'une classification basée uniquement sur l'évaluation motrice lors du diagnostic est limitée, la classification « classique » de la SMA devient de moins en moins adaptée pour les études cliniques actuelles. Pour assurer la cohérence et l'uniformité des mesures et du suivi thérapeutique, il a été recommandé de reclasser plus simplement les patients en « *non-sitters* », « *sitters* » et « *walkers* » (**Figure 3**) (Calucho et al., 2018; Finkel et al., 2018; Mercuri et al., 2018). Cette classification a l'avantage de considérer la SMA comme un continuum et se concentre sur l'état fonctionnel actuel du patient. Néanmoins, aucune classification ne permet de couvrir parfaitement le suivi de chacune des formes de la SMA, pourtant cruciale dans le scénario actuel d'avancées thérapeutiques, dans la perspective de dépistage néonatal et de diagnostic précoce pour initier des traitements.

### 2.1. SMA de type I : forme infantile sévère (maladie de Werdnig-Hoffmann)

La SMA de type I, ou maladie de Werdnig-Hoffmann, correspond à la forme la plus répandue puisque 50 à 60% des patients diagnostiqués en sont atteints (Markowitz et al., 2004; Meldrum et al., 2007). Cette forme est particulièrement sévère avec une manifestation avant l'âge de six mois et une espérance de vie ne dépassant généralement pas l'âge de deux ans si le patient ne bénéficie pas d'un des trois traitements actuellement disponibles. Les formes les plus précoces de SMA de type I peuvent se manifester *in utero* par une diminution des mouvements fœtaux et les nouveau-nés sont généralement hypotoniques et atteints d'une atrophie musculaire globale. Les enfants présentent une faiblesse musculaire symétrique des muscles proximaux, qui s'étend progressivement aux extrémités des 4 membres et l'évolution extrêmement sévère de cette maladie mène à la dénervation de près de 95% des unités motrices en quelques mois (Swoboda et al., 2005). L'ampleur de l'atteinte musculaire rend impossible l'acquisition de la position assise. Durant la croissance des enfants, une déformation typique de la cage thoracique va apparaître, ainsi qu'une scoliose

irréversible. Ces enfants présentent également une atteinte du diaphragme qui est à l'origine d'une détresse respiratoire associée à un risque accru d'infections. Ces enfants rencontrent également des difficultés pour s'alimenter (De Sanctis et al., 2016; Markowitz et al., 2012).

Type	Age d'apparition	Espérance de vie	Fonction motrice	Symptômes	Nombre de copie de SMN2
<b>Type 0</b>	Congénital	< 6 mois	Pas de fonctions motrices	Faiblesse musculaire sévère à la naissance Hypotonie sévère Absence de réflexe Diplégie faciale Détresse respiratoire précoce Contractures articulaires	1
<b>Type I</b>	0 – 6 mois	< 2 ans sans assistance respiratoire	Incapacité à s'asseoir	Faiblesse musculaire Hypotonie Posture en « jambes de grenouille » Fasciculations de la langue Défauts de succion et de déglutition Détresse respiratoire précoce Absence de réflexe	2
<b>Type II</b>	6-18 mois	70% atteignent l'âge de 25 ans	Position assise mais incapacité à marcher	Faiblesse proximale Hypotonie Tremblement des mains Diminution des réflexes Capacités intellectuelles normales à l'adolescence Scoliose	2-3
<b>Type III</b>	> 18 mois	Proche de la normale	Station debout et marche	Tremblement des mains Absence de réflexe rotulien Scoliose	3-4
<b>Type IV</b>	> 20 ans	Normale	Normale	Faiblesse musculaire très légère	≥4

**Tableau 1 : Classification des différentes formes d'amyotrophies spinales proximales. Adapté de (Farrar et al., 2017).**

## 2.2. Amyotrophie spinale infantile de type II : forme infantile intermédiaire

Cette forme, considérée comme intermédiaire, affecte environ 45% des patients. Elle se développe entre 6 et 18 mois après la naissance et se caractérise par une évolution plus lente que la SMA de type I. Le développement clinique de cette forme est rapide et évolue généralement par palier pour ensuite se stabiliser (Mercuri et al., 2016). Les patients atteints de cette forme acquièrent la position assise pouvoir cependant se maintenir debout ou marcher de manière autonome. Les symptômes de l'atteinte neuromusculaire se manifestent également par une absence du réflexe ostéo-tendineux, une atrophie et des fasciculations des muscles de la langue, ainsi que des tremblements spontanés des mains. Ces enfants présentent généralement des signes sévères de scoliose et une forte détresse respiratoire dont la prise en charge peut permettre d'allonger l'espérance de vie de jusqu'à un âge adulte avancé (Oskoui et al., 2017). Avant l'émergence des traitements actuels, cette forme était

associée à un pronostic vital variable (Araki et al., 2003; Markowitz et al., 2012).

### 2.3. Amyotrophie spinale infantile de type III : forme juvénile (maladie de Kugelberg-Welander)

Cette forme modérée de la maladie, également appelée forme juvénile, touche environ 8% des patients. Elle se manifeste entre 18 mois et 20 ans et est associée à une espérance de vie relativement proche de celle observée dans la population générale (Kuru et al., 2009). Ces enfants acquièrent la marche de manière normale mais le déclenchement de la maladie entraîne des chutes fréquentes puis des difficultés à se déplacer. L'atrophie musculaire mise en jeu est plus proximale que chez les patients SMA de type II (muscles des épaules et du bassin). Généralement d'évolution lente et progressive, elle se développe sur plusieurs années, puis se stabilise (Mercuri et al., 2016). Certains cas sont cependant sujets à une phase d'aggravation aiguë, caractérisée par la perte de la marche en quelques mois et bon nombre de ces patients présentent une hypertrophie des mollets. En fonction de l'âge d'apparition des symptômes, les patients atteindront l'âge adulte mais développeront des faiblesses musculaires associées à une faible endurance et des problèmes d'équilibre (Wadman et al., 2012).

Les SMA présentent donc un large spectre de phénotypes cliniques et cette classification en trois groupes est, en réalité, constituée de sous-groupes dont les frontières ne sont pas si strictement définies (Markowitz et al., 2012).

### 2.4. Formes rares d'Amyotrophie spinale infantile, type 0 et type IV

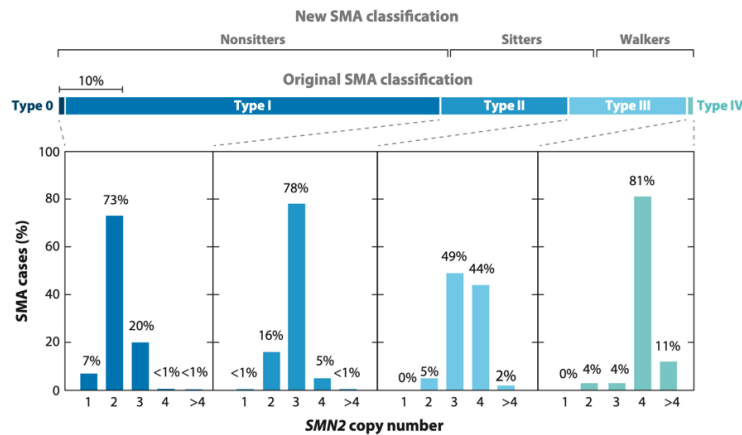
Parallèlement aux formes considérées comme plus classiques, deux autres formes de SMA, plus rares mais toujours liées à la mutation du gène *SMN1*, ont également été décrites. La première, d'une sévérité extrême, est appelée SMA de type 0, et correspond à une forme très précoce se caractérisant par une forte hypotonie anténatale (Sarnat and Trevenen, 2007). La seconde est une forme qui se développe chez l'adulte entre 20 et 35 ans, dont la progression reste lente et limitée. Elle se manifeste par une faiblesse progressive des muscles des bras et des cuisses mais les patients conservent la marche et leur espérance de vie n'est pas diminuée (Markowitz et al., 2012; Pearn, 1978).

Dans la nouvelle classification, tous les patients de type 0 et I et certains patients de type II qui sont incapables de s'asseoir de façon autonome entrent dans la nouvelle catégorie des « *non-sitters* ». Les individus de type II et certains individus de type III qui sont incapables de marcher seuls entrent dans la catégorie des « *sitters* ». Enfin, la majorité des individus de type III et tous les individus de type IV entrent dans la catégorie des « *walkers* » (**Figure 3**).

Cependant, depuis l'apparition des nouveaux traitements pour la SMA, les trajectoires de la maladie diffèrent significativement de ce qui était initialement connu et nous faisons face à l'émergence de nouveau phénotype. Par exemple, les patients dont l'apparition est survenue avant l'âge de six mois (SMA de type I) pourraient atteindre la position assise (SMA



de type II) si le traitement est initié suffisamment tôt. Ainsi, il est maintenant plus approprié de s'appuyer sur une combinaison de paramètres : l'âge d'apparition, le nombre de copies de *SMN2* et l'âge au début du traitement médicamenteux plutôt que sur les sous-types traditionnels pour définir une classification clinique de la SMA.



**Figure 3 : Formes cliniques de la SMA selon les classifications et leurs corrélations avec le nombre de copies de *SMN2*.** Adapté de (Wirth et al., 2020).

### 3. Les atteintes cellulaires de la SMA

Bien que la SMA ait traditionnellement été classée comme une maladie des motoneurones dont la dégénérescence serait responsable des atteintes musculaires, il devient de plus en plus clair que d'autres types cellulaires et tissus sont également vulnérables aux niveaux réduits de SMN (**Tableau 2**).

#### 3.1. Atteintes du système nerveux central

Les études histologiques d'échantillons de patients, issus de biopsies post-mortem, ont été la première source d'information et ont révélé que l'une des caractéristiques principales de cette pathologie reposait sur la disparition progressive des motoneurones (MNs) de la corne antérieure de la moelle épinière, responsables des défauts d'activité motrice (Hoffmann, 1893; Kugelberg, 1947; Werdnig, 1891). Ces cellules présentent des signes de dégénérescence. En effet, les observations réalisées sur ces biopsies de patients démontrent de profonds changements morphologiques et moléculaires, des MNs, qui s'accroissent avec la sévérité de la maladie. Les MNs qui dégèrent, dit chromolytiques, adoptent une morphologie arrondie (« *ballooned neurons* ») par des phénomènes de rétraction cellulaire (Harding et al., 2015; Murayama et al., 1991). De plus, les analyses immunohistochimiques ont révélé une localisation anormale à la périphérie des corps cellulaires de neurofilaments phosphorylés, de protéines des microtubules, de la matrice extracellulaire ou d'adhésion (Chou et al., 1997; Ito et al., 2011; Piras et al., 2017). Ces MNs présentent également une accumulation de protéines ubiquitinilées et de cathepsine D suggérant une activité

protéolytique accrue par le lysosome et le protéasome (Ando et al., 2020; Chou et al., 1997; Murayama et al., 1991; Rodriguez-Muela et al., 2018). Les analyses histologiques ont révélé une augmentation de l'apoptose dans la moelle épinière des patients, détectée par le marquage TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling) et une diminution d'expression de la protéine anti-apoptotique (Bcl-2) a été observée dans les MNs de moelle épinière de fœtus SMA (Piras et al., 2017; Soler-Botija et al., 2002).

Différentes études démontrent également d'autres atteintes du système nerveux central. L'analyse d'échantillons post-mortem de moelles épinières de patients révèlent des signes d'inflammation avec notamment une astroglie qui s'intensifie avec la sévérité de la maladie (Araki et al., 2003; Kuru et al., 2009; Rindt et al., 2015; Soler-Botija et al., 2002). D'autre part, une neuropathie sensorielle a été décrite chez certains patients SMA de type I et une atteinte du thalamus a également été observée avec une perte neuronale et une activation anormale de la microglie (Carrasco et al., 2019; Harding et al., 2015; Kuru et al., 2009; Rudnik-Schöneborn et al., 2008, 2003). Notons que les atteintes tissulaires observées chez des fœtus atteints de SMA de type 0 se distinguent des autres formes de SMA puisque la dégénération extrêmement rapide des MNs n'est pas associée à l'activation de la microglie ou à la prolifération astrocytaire, car non mobilisés à ces stades de développement (Sarnat and Trevenen, 2007). Chez des souris SMA sévère et intermédiaire, il a été observé que la restauration spécifique de la protéine SMN dans les astrocytes, améliorerait leur survie ainsi que les défauts neuromusculaires (Rindt et al., 2015). L'expression accrue des cytokines pro-inflammatoires a également été partiellement normalisée chez les souris traitées. Ces éléments soulèvent les questions suivantes : la diminution de la protéine SMN est-elle toxique pour les astrocytes ? L'astroglie observée est-elle une atteinte physiopathologique de la SMA ?

### 3.2. Atteintes musculaires

L'atteinte progressive des muscles fait partie des caractéristiques majeure de la SMA. Cliniquement, cela s'observe par la perte progressive du volume musculaire et de la mobilité allant jusqu'au décès du patient dans les formes les plus sévères.

Chez les patients, l'atteinte des muscles squelettiques semble être au moins en partie consécutive à une perte d'innervation (Mercuri et al., 2004; Thirunavukkarasu et al., 2020). Les observations histologiques révèlent la présence de fibres hypertrophiques et le regroupement de fibres atrophiées suite à une déstabilisation des myofibrilles, traduisant des stades de dénervation différents au sein du muscle (Mastaglia and Walton, 1971). Les fibres atrophique sont accompagnées de zones de nécrose, de fibrose et d'infiltrations graisseuses qui remplacent les fibres lésées (Kuru et al., 2009; Mastaglia and Walton, 1971; Oates et al., 2012; Ohi et al., 2011).

Les patients, atteints d'une forme moins sévère de SMA, présentent un phénotype de dystrophie musculaire comprenant des fibres en dégénérescence/régénération et un niveau sérique élevé de créatine kinase (Alves et al., 2020; Freigang et al., 2021; Muqit et al., 2004;

Nicole et al., 2002). Comme pour les atteintes neuronales, la SMA de type 0 fait exception. En effet, chez les fœtus SMA de type 0 de 20 semaines, l'atteinte neuronale est si précoce que le système musculaire, encore immature, est incapable de réagir à la dénervation et préserve ainsi son intégrité à ce stade de développement (Sarnat and Trevenen, 2007).

Cependant, au-delà de la perte d'innervation, une atteinte directe des cellules musculaires a également été fortement suggérée. Durant la période prénatale, un retard myogénique a été rapporté dans des cultures myogéniques primaires issues d'échantillons fœtaux SMA de type I (Martínez-Hernández et al., 2014, 2009). Ce retard myogénique a été confirmé, d'une part, par des analyses de muscles postnataux SMA. Et d'autre part, *in vitro*, dans des cellules musculaires dérivées de cellules souches embryonnaire humaine SMA de type I, révélant des taux anormalement élevés de fibres positives pour la myosine embryonnaire (Hellbach et al., 2018; Martínez-Hernández et al., 2014; Stevens et al., 2008). De plus, des dommages mitochondriaux et une altération de la biogenèse mitochondriale ont été documentés, *in vitro*, dans des cellules musculaires dérivés de patients SMA de type I-III (Hellbach et al., 2018; Ripolone et al., 2015). Ces données suggèrent une atteinte dans la régulation de la différenciation et/ou du maintien des fibres musculaires. D'autre part, différentes études suggèrent des déficits musculaires intrinsèques à la SMA dans les modèles de souris SMA sévère, avec notamment une altération de la différenciation myogénique, de la taille des fibres musculaires et de la fusion des myoblastes en myotubes (Bowerman et al., 2012; Boyer et al., 2014; Bricceno et al., 2014; Kim et al., 2020; McCormack et al., 2021). En parallèle, une dégénérescence neuronale a été observée dans un modèle de co-cultures entre des explants de moelle épinière de rats normaux et des myotubes différenciés à partir de myoblastes issus de patients SMA suggérant qu'une toxicité pouvait être amenée par le muscle déficient en protéine SMN (Braun et al., 1997, 1995; Guettier-Sigrist et al., 2001).

Parallèlement à ces atteintes intrinsèques, des défauts de développements ont été suggérés. En effet, au cours du développement embryonnaire normal, les MNs n'ayant pas réussi à projeter leur axone sur une cible musculaire spécifique entrent en apoptose entre la 8<sup>ème</sup> et la 13<sup>ème</sup> semaine de grossesse. Des analyses de microscopie électronique ont constaté que ce phénomène s'étend sur une période anormalement prolongée chez les fœtus SMA de type I par rapport aux contrôles et pourrait persister après la naissance, suggérant des défauts de mise en place des jonctions neuromusculaires (NMJ) (Fidziańska and Rafalowska, 2002; Kong et al., 2021; Simic et al., 2000; Soler-Botija et al., 2002). Ces résultats ont été appuyés par des défauts d'agrégation des récepteurs à l'acétylcholine (AChR), de transport des vésicules synaptiques et des terminaisons nerveuses aberrantes, observés chez des fœtus SMA de type I de 12 à 18 semaines (Martínez-Hernández et al., 2014). L'immaturité des NMJ semble d'ailleurs persister après la naissance chez les patients SMA de type I, où l'expression accrue de la forme fœtale de ces récepteurs, l'AChR- $\gamma$ , a été décrite (Harding et al., 2015). Ainsi, des défauts dans la formation et le maintien des NMJ et/ou du muscle dans la SMA, pourrait précéder la mort des MNs. Cependant, la question de savoir si les altérations des NMJ sont secondaires à un défaut des motoneurones ou si le défaut des motoneurones est la

pathologie principale reste aujourd'hui un sujet à débat (Boido and Vercelli, 2016).

Il est important de noter que toutes les NMJ ne sont pas touchés de la même manière. Ce phénomène de vulnérabilité différentielle a été bien caractérisé dans des modèles murins SMA, où il semble y avoir des niveaux élevés de perte de NMJ dans certains muscles (abdominaux) et de très faibles niveaux de perte voire aucune perte de NMJ dans d'autres (craniaux) (Comley et al., 2016; Murray et al., 2013, 2008). Bien que les raisons de cette vulnérabilité différentielle ne soient pas claires, ces études suggèrent que la vulnérabilité des NMJs seraient due à la fois à une susceptibilité autonome des MNs à divers stress, et à des défauts périphériques précoces. Ces défauts contribueraient ainsi à la dénervation musculaire, puis, à la perte des MNs (Fidziańska and Rafalowska, 2002; Wadman et al., 2012).

### 3.3. Autres atteintes

Diverses études ont fréquemment reporté des défauts cardiaques chez les patients SMA. Les patients présentent des arythmies, des cardiomyopathies associées à des défauts atrio-ventriculaires, atriaux ou aortiques (El-Matary et al., 2004; Menke et al., 2008; Møller et al., 1990; Mulleners et al., 1996; Rudnik-Schöneborn et al., 2008). Une analyse rétrospective a recensé soixante-douze études portant sur un total de 264 patients SMA présentant une pathologie cardiaque (Wijngaarde et al., 2017). Cette analyse a mis en avant la présence d'une pathologie cardiaque structurelle, avec des défauts principalement septaux et des anomalies de la voie d'éjection cardiaque chez les patients SMA de type I. Les troubles du rythme cardiaque ont quant à eux été le plus fréquemment rapportés chez les patients présentant des types de SMA plus légers (SMA de type II et III). Cependant, pour l'ensemble des études, il n'est pas clairement déterminé si ces problèmes sont dus à des défauts du système nerveux autonome ou à une atteinte directe du muscle cardiaque. Des défauts vasculaires ont également pu être observés, notamment des thromboses des vaisseaux sanguins (Araujo et al., 2009; Rudnik-Schöneborn et al., 2010).

Tissu	Patient ou modèle animal		Observations	Références
<b>Muscle</b>	Patient	SMA Type I-III	Myoblastes immatures avec défauts de fusion	(Arnold et al., 2004; Martínez-Hernández et al., 2009)
			Anomalie musculaire lors de coculture avec MNs sains	(Braun et al., 1995)
			Développement musculaire retardé, hypertrophie, altération de la biogenèse mitochondriale, faiblesse musculaire, manque de coordination	(Hellbach et al., 2018, 2018; Lipnick et al., 2019)
	Animal	Souris Taiwanese ; SMN2	Changements moléculaires dans le muscle avant et indépendamment de la dégénérescence motrice	(Monani et al., 2000; Riessland et al., 2010; Wishart et al., 2010)
		Souris SMN2	Différenciation prématurée des cellules satellites du muscle squelettique et incapacité à former efficacement des myotubes multinucléés	(Hayhurst et al., 2012)
		Souris Δ7	Diminution de la taille des fibres musculaires	(Le et al., 2005; Lee et al., 2011)
		Modèle de souris conditionnel	La protéine SMN a un rôle dans la croissance musculaire	(Martinez et al., 2012)
		Souris KO SMN muscle spécifique	L'absence de SMN dans le muscle provoque la nécrose et dystrophie du muscle, qui conduit à une paralysie musculaire	(Cifuentes-Diaz et al., 2001)
		<i>Drosophila</i>	SMN est une protéine sarcomérique	(Rajendra et al., 2007)
	<i>Drosophila</i> KO SMN muscle spécifique	L'absence de SMN dans le muscle conduit la létalité larvaire	(Chang et al., 2008)	
<b>Système nerveux afférent</b>	Patient	SMA Type I	Dégénérescence axonal	(Rudnik-Schöneborn et al., 2003)
		SMA Type I-II	Dégénérescence axonale des nerfs sensitifs chez les patients SMA type I ; pas retrouvé chez les patients SMA type II	(Yonekawa et al., 2013)
	Animal	Souris Δ7	Réflexes proprioceptifs réduits dans les motoneurons et dysfonctionnement du circuit spinal Défauts de myélinisation, défauts de développement des neurones sensoriels, perte de synapse, déficits fonctionnels, neuroinflammation	(Hunter et al., 2014; Ling et al., 2012, 2010; Mentis et al., 2011; Tarabal et al., 2014)
		Souris SMN2	Les neurones sensoriels isolés ont des neurites plus courts et des cônes de croissance plus petits	(Jablonka et al., 2006)
		Modèle de souris sévère inductible	Défauts sensoriels moteurs une conséquence de la vulnérabilité des motoneurons	(Gogliotti et al., 2012)
<b>NMJ</b>	Patient	SMA Type I	Développement arrêté/retardé des NMJ, anomalies fonctionnelles des NMJ	(Harding et al., 2015)
	Animal	Souris KO SMN MN spécifique	Anomalies structurelles des NMJ	(Park et al., 2010)
		Souris Δ7 ; SMN2	Anomalies structurelles et fonctionnelles des NMJ, diminution de la densité et de la libération des vésicules présynaptiques	(Cifuentes-Diaz et al., 2001; Dachs et al., 2011; Ling et al., 2012; Murray et al., 2008; Schreml et al., 2013)
<b>Cerveau</b>	Patient	SMA Type I	Lésions et dégénérescence du thalamus	(Ito et al., 2004; Shishikura et al., 1983)
	Animal	SMN2	Neurogenèse de l'hippocampe et développement cérébral altérés	(Wishart et al., 2010)
<b>Cœur</b>	Patient	SMA Type I-III	Défauts structurels, bradycardie, anomalies de l'ECG, fibrose myocardique	(Palladino et al., 2011; Rudnik-Schöneborn et al., 2010; Wijngaarde et al., 2017)
		SMA Type 0	Défaut septal congénital	(Rudnik-Schöneborn et al., 2008)
	Animal	Souris Δ7	Défauts cardiaques apparents à P7 ; bradycardie développée par P14	(Bevan et al., 2010)
		Souris Δ7 ; SMN2	Bradycardie sévère avec réduction de la fréquence cardiaque, de l'efficacité de pompage et du flux sanguin	(Heier et al., 2010)
		Souris Δ7 ; SMN2	Fréquence cardiaque considérablement réduite dès P3-P5	(Shababi et al., 2010)

		Modèle de souris sévère inducible	Bradycardie importante à P3	(Gogliotti et al., 2012)
		Souris Taiwanese	Amincissement du septum interventriculaire	(Schreml et al., 2013)
<b>Système vasculaire</b>	Patient	SMA Type I	Patients : nécrose des doigts entre 3 et 5 mois	(Araujo et al., 2009; Rudnik-Schöneborn et al., 2010)
	Animal	Souris Δ7	Les souris traitées à la TSA vivant plus de 27 jours ont développé une ischémie tissulaire et une nécrose de la queue et des oreilles	(Narver et al., 2008)
			Les souris traitées avec scAAV9 ont développé des pavillons nécrotiques de P45 à P70	(Foust et al., 2010)
		Souris Taiwanese modéré	Nécrose de la queue et des oreilles	(Hsieh-Li et al., 2000)
		Souris SMN2	Diminution de la densité des capillaires musculaires et du nombre de ramifications ; augmentation du diamètre de capillaires	(Somers et al., 2012)
Souris Taiwanese sévère	Diminution de la densité des capillaires musculaires	(Schreml et al., 2013)		
<b>Os</b>	Patient	SMA Type I-III	Faible densité minérale osseuse, fractures osseuses congénitales, côtes extrêmement fines, altération de la formation du cartilage	(Hensel et al., 2020; Martinez et al., 2018; Wasserman et al., 2017)
	Animal	Souris Taiwanese modéré	Ostéoporose avec diminution des marqueurs de différenciation ostéoblastique	(Hsieh-Li et al., 2000; Shanmugarajan et al., 2009)
Diminution des taux de minéraux			(Shanmugarajan et al., 2007)	
<b>Pancréas</b>	Patient	SMA Type I	50 % des patients avaient des taux anormaux de glucose et de cellules α	(Bowerman et al., 2012)
	Animal	Souris 2B1	Anomalies dans les îlots pancréatiques avec plus de cellules α que β ; hyperglycémie, hyperglucagonémie	(Bowerman et al., 2012, 2009)
<b>Poumon</b>	Patient	SMA Type I-III	Problèmes respiratoires et besoin de ventilation	(Kapur et al., 2019)
	Animal	Souris Taiwanese sévère	Décoloration des poumons évocatrice d'infarctus pulmonaire	(Schreml et al., 2013)
<b>Foie</b>	Animal	Souris Taiwanese sévère	Développement anormal du foie, atrophie, stéatose	(Deguise et al., 2019; Hua et al., 2011; Szunyogova et al., 2016)
		Souris KO SMN spécifique du foie	L'absence de SMN dans le foie est létale qui entraîne une surcharge en fer et une atrophie du foie	(Vitte et al., 2004)
<b>Intestin</b>	Animal	Souris Taiwanese sévère	Œdèmes intestinaux	(Schreml et al., 2013)
<b>Appareil reproducteur</b>	Animal	Souris (Smn1 <sup>-/-</sup> ;SMN2 <sup>+</sup> )	Anomalies du développement des gamètes	(Chang et al., 2020; Ottesen et al., 2016)

**Tableau 2 : Résumé des atteintes multi-systémiques observées chez les patients et les modèles animaux SMA. Adapté de (Singh et al., 2021).**

Dans l'ensemble, un grand nombre d'études menées chez des patients atteints de SMA et des modèles animaux SMA, tels que la souris, soulignent le rôle de la protéine SMN dans la plupart (sinon tous) les tissus, y compris le cerveau, la moelle épinière, le foie, les poumons, le cœur, les muscles squelettiques, les ovaires et les testicules (**Tableau 2**). Ainsi SMN semble être une protéine impliquée à la fois dans le développement et la fonction de différents tissus.

#### 4. Bases génétiques et moléculaires des défauts associés

##### 4.1. Le locus SMA

Comme dit précédemment, les études menées dans les années 1990 ont permis de démontrer l'implication du locus 5q11.2-13-3 (Brzustowicz et al., 1990; Gilliam et al., 1990; Melki et al., 1990) et du gène *SMN1* comme responsable de la SMA (Lefebvre et al., 1995). Ce locus correspond, en réalité, à la duplication inversée d'une région d'environ 500 kb, l'une télomérique (originale) et l'autre centromérique (dupliquée) (**Figure 4**). Des études phylogénétiques ont démontré que cette duplication était absente chez les rongeurs, mais qu'elle avait eu lieu avant la séparation des lignages entre *Homo Sapiens* et *Pan Troglodyes* (chimpanzé), permettant d'établir qu'elle était survenue il y a environ 5 millions d'années. Le gène *SMN2* est ensuite apparu uniquement chez les humains (Courseaux et al., 2003; Rochette et al., 2001; Schrank et al., 1997). Ces régions dupliquées hautement homologues codent pour 4 gènes principaux :

- **Survival Motor Neuron (SMN) :**

Ce gène est présent sous 2 formes *SMN1* (télomérique) et *SMN2* (centromérique), codant pour une protéine ubiquitaire, SMN. Chez 95% des patients atteints de SMA, la forme télomérique est délétée ou mutée de manière homozygote (Hahnen et al., 1995; Lefebvre et al., 1995). Dans les 5% restant, les patients présentent des mutations ponctuelles, principalement des substitutions de *SMN1* (Bussaglia et al., 1995; Rochette et al., 1997).

- **Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein (NAIP) :**

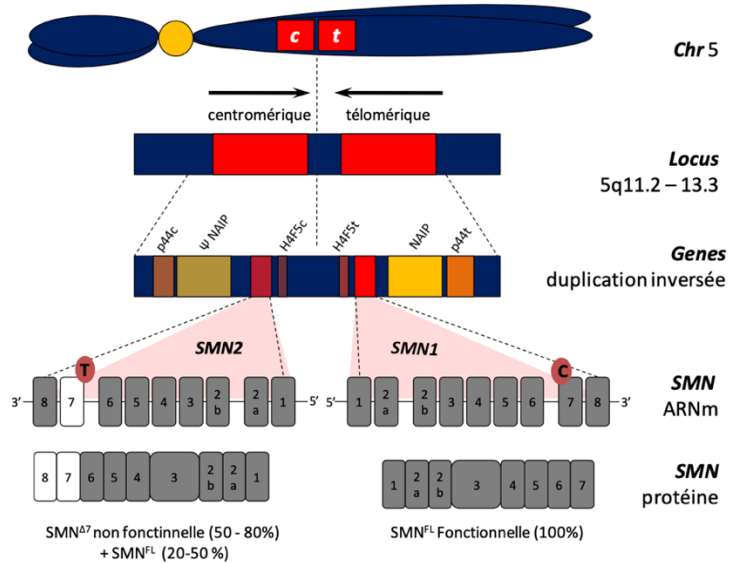
Ce gène code une protéine impliquée dans l'inflammasome, capable de reconnaître spécifiquement un agent pathogène et ainsi déclencher des réactions de défense cellulaire tels que l'apoptose (Kofoed and Vance, 2012; Roy et al., 1995). Dans environ 50% des patients SMA de type I et 20% des patients SMA de type II et III confondus, la copie télomérique de ce gène est délétée (Hassan et al., 2020; He et al., 2013).

- **Small EDRK-Rich factor 1A (SERF1 ou H4F5) :**

Ce gène code une protéine décrite comme impliquée dans l'agrégation et l'assemblage des fibres amyloïdes (Falsone et al., 2012; Scharf et al., 1998). Certaines données, non reproduites à ce jour, ont suggéré une corrélation inversée entre le nombre de copies de ce gène et la sévérité de la maladie (Amara et al., 2012). Toutefois, les données suggèrent que les délétions de NAIP et de P44 seules ne contribueraient pas à la pathogénèse de la SMA (Bürglen et al., 1997; Burlet et al., 1996; Hassan et al., 2020; He et al., 2013; Theodorou et al., 2015).

- **General Transcription Factor IIH, polypeptide 2 (GTF2H2 ou p44) :**

Ce gène code la sous-unité d'un complexe initiateur de la transcription de l'ARN polymérase II impliqué dans la transcription basale des gènes et dans les mécanismes d'excision-réparation des nucléotides (Bürglen et al., 1997; Carter et al., 1997; Humbert et al., 1994). Ce gène télomérique est absent ou tronqué dans 73% des patients SMA de type I, et dans 12% des patients SMA de type II et III confondus (Bürglen et al., 1997).



**Figure 4 : Gènes du locus SMA et description des gènes SMN.** Le locus SMA humain, porté par le chromosome 5, est composé d’une duplication de 500kb en sens inverse. Les parties télomériques et centromériques codent pour 4 gènes principaux, p44, NAIP, SMN et H4F5. Les gènes SMN sont composés de 9 exons et l’exon 7 porté par *SMN2* diffère d’une base nucléotidique (en rouge). Les exons inclus (en gris) et exclus (en blanc) aboutissent à la production des protéines SMN-FL/-Δ7. *Adapté de (Markowitz et al., 2012).*

#### 4.2. Les gènes *SMN1* et *SMN2*

Chez l’Homme, et uniquement chez l’Homme, le gène *SMN* existe sous deux copies, *SMN1* (centromérique) et *SMN2* (télomérique), dont les séquences génomiques sont extrêmement proches (Lefebvre et al., 1995; Lorson et al., 1999). Alors que la duplication du locus SMA est un événement très ancien dans l’évolution des espèces, les changements de nucléotides ponctuels ayant donné naissance au gène *SMN2*, dans la partie centromérique, ne sont apparues que très récemment (Rochette et al., 2001). En effet, un grand nombre de primates tels que les chimpanzés, les gorilles ou les orangs outangs sont également dotés du gène *SMN1* dupliqué dans la partie centromérique. Cependant, la comparaison des séquences de ce gène dupliqué révèle qu’aucune de ces espèces n’est porteuse du gène *SMN2*. En revanche, l’Homme, quel que soit son appartenance ethnique en est porteur (Africaines, eurasiennes, asiatiques), démontrant que le gène *SMN2* est spécifique à l’*Homo Sapiens* (Amara et al., 2012; He et al., 2013; Lefebvre et al., 1995). Les séquences génomiques des gènes *SMN1* et *SMN2* sont extrêmement proches, et sont dotées de promoteurs équivalents (Burghes and Beattie, 2009; Bulet et al., 1998). Ces gènes, de 29 kb, sont composés de 9 exons, originellement numérotés de 1 à 8 puisque l’exon 2 était finalement composé de deux exons rebaptisés 2a et 2b (Bürglen et al., 1997). Ces gènes expriment un transcrite ubiquitaire de 1,7 kb.

Alors que la majorité des transcrits émanant du gène *SMN1* contiennent l’exon7, ce dernier n’est inclus que dans 10 à 20% des transcrits issus de *SMN2* selon les études et les



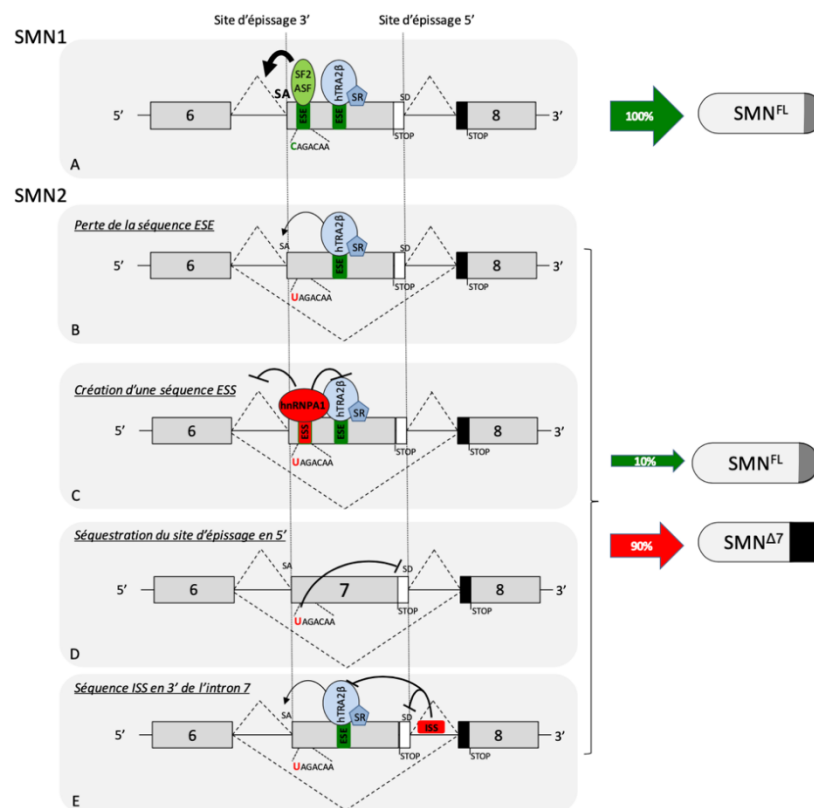
modèles cellulaires utilisés (Lefebvre et al., 1995; Lorson et al., 1999; Singh et al., 2012). Les ARNm SMN-FL et SMN $\Delta$ 7, respectivement avec et sans l'exon 7, correspondent aux isoformes majoritaires bien qu'il ait été montré un large panel d'isoformes pour les ARN pré-messagers *SMN1* et *SMN2*, dû à l'épissage des exons 3, 4, 5, 6 et 7 (Singh et al., 2012).

#### 4.3. Mécanismes d'épissage alternatif de *SMN2*

Les gènes *SMN1* et *SMN2* ne diffèrent que de 5 nucléotides (homologie de 99,8%) dont la majorité se trouvent dans des introns et n'ont donc aucune conséquence sur la séquence protéique. Il a été montré que seule la transition d'une cytosine (*SMN1*) en thymine (*SMN2*) (C6T), localisée sur le 6<sup>ème</sup> nucléotide de l'exon 7 (Bürglen et al., 1997), empêche le recrutement de facteurs impliqués dans l'épissage, et conduit à l'exclusion de l'exon 7 dans 90% des ARNm (Lorson et al., 1999; Singh et al., 2011; Souček et al., 2019). Dans ce cas, la protéine SMN $\Delta$ 7 produite est dépourvue des 16 acides aminés normalement présent en C-terminal, et acquiert à la place le motif EMLA reconnu comme signal de dégradation, diminuant ainsi la stabilité de la protéine (Cho and Dreyfuss, 2010). Néanmoins, ce gène *SMN2* est aussi capable de produire l'ARNm complet, contenant l'exon 7 (SMN-FL), et dont la protéine est fonctionnelle, mais dans seulement 10 à 20% des cas.

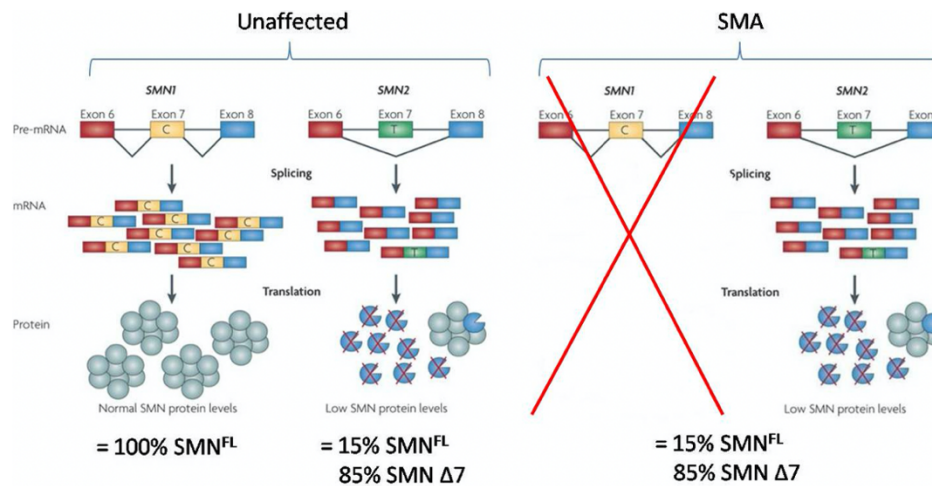
Cette modification du profil d'épissage, qui aboutit à l'exclusion préférentielle de l'exon 7, peut être expliquée par différents mécanismes. D'une part, la transition C6T altère la séquence activatrice d'inclusion de l'exon, dite ESE (Exon Splicing Enhancer). En effet, dans le cas du gène *SMN1*, la séquence ESE permet le recrutement de protéines impliquées dans la reconnaissance de la jonction intron-exon et dans l'assemblage du spliceosome, tels que les facteurs d'épissage SF2/ASF, les protéines SR ou U2 (**Figure 5A**). Ces protéines permettent l'inclusion de l'exon 7 dans 100% des transcrits. En revanche, dans le cas du gène *SMN2*, la transition C6T supprime la séquence ESE (**Figure 5B**). Le facteur d'épissage SF2/ASF n'étant plus recruté, cela entraîne l'affaiblissement du site accepteur (SA) d'épissage 3' de l'exon. Ainsi, seule une faible quantité de SMN<sup>FL</sup> est produite (Cartegni and Krainer, 2002). D'autre part, la transition C6T entraîne également la création d'un site de répression de l'épissage, dit ESS (Exon Splicing Silencer), sur lequel le facteur de répression de l'épissage hnRNPA1 va pouvoir se lier (**Figure 5C**) (Kashima et al., 2007). Cette liaison va masquer le site accepteur (SA) de l'épissage de l'exon 7 et inhiber la fonction de Tra2 $\beta$  et des protéines SR (Hofmann et al., 2000; Kashima et al., 2007; Prior et al., 2009). Ces deux processus ne sont pas exclusifs mais contribuent à la diminution de la force du SA de l'exon 7 ayant pour conséquence l'exclusion préférentielle de celui-ci. En parallèle, il a été montré que la transition C6U de *SMN2* en 3' entraîne la formation d'une structure secondaire en « tige-boucle », en 5' de l'exon 7, nommée TSL2 (Terminal stem loop2) qui séquestre et inhibe le site donneur (SD) d'épissage (Singh et al., 2007) (**Figure 5D**). Enfin, un site inhibiteur d'épissage d'introns, dit ISS (Intronic Splicing Silencer), situé à proximité du site d'épissage de l'exon 7, permet le recrutement de protéines inhibitrices et contribue à la faiblesse du SD de l'exon 7 (Singh et al., 2006) (**Figure 5E**). Il a aussi été démontré que des interactions longues distances provoquent une inhibition

de l'inclusion de l'exon 7 de *SMN2* par la formation de structures secondaires complexes au niveau de l'intron 7 qui affaiblissent la définition du site d'épissage en 5' et limitent la fixation de facteurs de promotion de l'inclusion (U1 snRNA) (Zhang et al., 2013).



**Figure 5 : Modèles de régulation de l'épissage de l'exon 7 des gènes *SMN1* et *SMN2*.** (A) Le gène *SMN1* contient une séquence ESE (Exonic Splicing Enhancer) reconnue par les facteurs d'épissage SF2/ASF qui permettent le recrutement de protéines SR et hTRA2β et renforce le site accepteur d'épissage (SA) de l'exon 7. Le gène *SMN1* produit 100% de protéines SMN-FL. (B) La transition C6U de l'exon 7 du gène *SMN2* élimine la séquence ESE et affaiblit le SA. Cela se traduit par l'épissage préférentiel de l'exon 7. (C) La modification C6U entraîne la création d'un site ESS (Exon Splicing Silencer) qui permet la fixation du facteur de répression de l'épissage de l'exon 7, hnRNP A1. (D) La modification C6U du site d'épissage 3' de l'exon 7 provoque la formation d'un contexte inhibiteur dans le site d'épissage 5' par la séquestration du site donneur d'épissage (SD). (E) La présence de séquences ISS (Intronic Splicing Silencer) dans l'intron 7 diminue le recrutement des protéines activatrices de l'épissage. *Adapté de (Dominguez et al., 2017; Singh et al., 2011).*

Ainsi, chez les patients SMA, où le gène *SMN1* n'est pas exprimé, seul le gène *SMN2* est alors en mesure de produire la protéine SMN-FL mais seulement à hauteur de 10-20% de la quantité normalement produite par *SMN1* (Figure 6).



**Figure 6 : Défaut de production de la protéine SMN chez les patients SMA.** Chez les patients sains, la protéine SMN<sup>FL</sup> est produite à la fois par les gènes *SMN1* et *SMN2* alors que chez les patients SMA, seul le gène *SMN2* produit de la protéine SMN<sup>FL</sup> mais en faible quantité. *Modifiée de (Burghes and Beattie, 2009).*

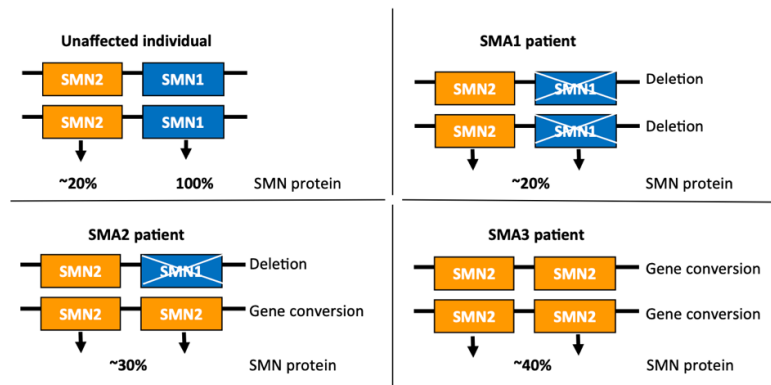
#### 4.4. Les gènes modificateurs de la SMA

La seule atteinte du gène *SMN1* ne peut cependant pas expliquer la grande hétérogénéité clinique de la SMA. L'existence d'autres acteurs moléculaires pouvant intervenir dans la modulation de cette sévérité a donc été envisagée. Outre la corrélation inverse entre la gravité de la maladie et le nombre de copies de *SMN2*, l'analyse génétique de cas familiaux atypiques a révélé la présence de modificateurs supplémentaires à l'intérieur et à l'extérieur de la région *SMN2* (Bernal et al., 2010; Pera et al., 2017; Ruhno et al., 2019). Ces modificateurs incluent la Plastine-3 (*PLS3*) et la Neurocalcine delta (*NCALD*) comme pouvant influencer la gravité de la maladie (Opera et al., 2008 ; Riessland et al., 2017).

##### 4.4.1. *Le gène modificateur SMN2*

La sévérité du phénotype SMA est principalement déterminée par le nombre de copies de *SMN2*, plus le nombre de copies est important, moins sévère est la maladie (Feldkötter et al., 2002; Verhaart et al., 2017). Le mécanisme de conversion génique de *SMN1* par *SMN2* explique l'augmentation du nombre de copies du gène *SMN2* chez certains patients (**Figure 7**) (Stabley et al., 2021; van der Steege et al., 1996). Cette augmentation du nombre de copies du gène *SMN2* permet la production d'une plus grande quantité de transcrite SMN-FL et est donc associée à une atténuation du phénotype. Le gène *SMN2* constitue le principal gène modificateur de la SMA. Bien que cette corrélation soit forte, elle n'est pas absolue. Ainsi, 73 % des patients SMA de type I portent deux copies de *SMN2*, 78 % des patients SMA de type II portent trois copies, 55 % des patients SMA type III portent trois ou quatre copies et 75 % des patients SMA de type IV ont quatre copies (Calucho et al., 2018; Feldkötter et al., 2002; Wirth et al., 2006). Il est très rare de trouver des patients ne possédant qu'une seule copie du gène

*SMN2*, associée au type 0. Néanmoins, 2 copies sont nécessaires au minimum pour que les patients survivent quelques mois (Vitali et al., 1999). Bien que le nombre de copies de *SMN2* module la sévérité de la maladie, il convient de garder à l'esprit que d'autres facteurs transrégulateurs influencent la quantité de SMN. Les variants au sein du gène *SMN2* peuvent également influencer la gravité ; par exemple, le variant faux-sens c.859G>C (p.Gly287Arg) augmente les transcrits *SMN2* de pleine longueur et influence ainsi positivement le phénotype SMA (Feldkötter et al., 2002; Prior et al., 2009). Par conséquent, le nombre de copies de *SMN2* seul est insuffisant pour faire une prédiction fiable de la sévérité de la SMA.



**Figure 7 : Influence du nombre de copies du gène *SMN2* sur la sévérité clinique de la SMA.** Le nombre de copie de *SMN2* est augmenté par la conversion du gène *SMN1*. Adapté de (Wirth, 2021).

#### 4.4.2. Potentiel contribution de gènes voisins de *SMN*

Le gène *NAIP* (Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein) est à proximité du gène *SMN* sur le chromosome 5 (Roy et al., 1995). Une étude sur 2 lignées de neuroblastomes, *in vitro*, (NSC-34 et Neuro2a) a montré que le produit de ce gène pouvait intervenir dans la protection des neurones de la mort induite par le calcium en interagissant avec l'hippocalcine et pouvait aussi inhiber directement les caspases 3 et 7 (Mercer et al., 2000). Le gène *P44* est voisin du gène *NAIP* en position télomérique. Il code la protéine P44, appartenant à la sous-unité du complexe TFIIH, impliqué dans la régulation de la transcription, le contrôle du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN (Bürglen et al., 1997; Matsuno et al., 2007). Il est à noter que les mutations de *NAIP* et *P44* sont surtout observés chez des patients SMA de type I, dans 50% des cas. Cela suggère que les délétions de *NAIP* et de *P44* seules ne sont pas impliquées dans la survenue de la SMA, mais pourraient être des modificateurs de la SMA, même si aucune donnée n'a démontré de corrélation directe (Bürglen et al., 1997; Burlet et al., 1996; Hassan et al., 2020; He et al., 2013; Theodorou et al., 2015).

#### 4.4.3. Modificateurs génétiques en dehors du locus *SMN2*

- **Plastine-3 (*PLS3*)**

La plastine-3 (*PLS3*) correspond au premier modulateur indépendant de SMN à avoir été identifié (Heesen et al., 2016; Oprea et al., 2008). En effet, l'équipe de B. Wirth a étudié 6

familles dans lesquelles des femmes porteuses de la délétion homozygote du gène *SMN1* étaient asymptomatiques. Elles possédaient pourtant le même nombre de copie du gène *SMN2* (3 ou 4 copies) que leurs frères ou sœurs atteints suggérant la présence de modificateurs de la sévérité de la maladie indépendants de *SMN2*. Des analyses transcriptomiques réalisées sur l'ARN total de cellules lymphoblastoïdes issues de ces familles, ont permis de mettre en évidence une surexpression du gène *PLS3* chez les femmes asymptomatiques en comparaison avec leurs apparentés malades.

Le gène *PLS3* est localisé sur le chromosome X et code la plastine 3, une protéine se liant à l'actine impliquée dans la dynamique du cytosquelette et dépendante du calcium (Glenny et al., 1981). Elle joue un rôle important dans l'axonogenèse (Dent and Gertler, 2003; Oprea et al., 2008). Une analyse plus approfondie d'échantillons de sang provenant d'une plus large population patients SMA et de témoins sains a confirmé cette association (Yanyan et al., 2014). Au sein d'un même groupe de patient SMA de type III ayant le même nombre de copies du gène *SMN2*, à savoir 3 copies, les patients ayant acquis la marche présentent des taux de *PLS3* supérieurs à ceux ne pouvant marcher (Yanyan et al., 2014). De plus, il a été démontré que seules les femmes post-pubères présentaient cette corrélation inverse entre la *PLS3* circulante et la sévérité de la maladie, suggérant que le rôle modificateur de *PLS3* dépend de l'âge et du sexe. Cette corrélation inverse a également pu être confirmée dans des modèles humains *in vitro* SMA (Boza-Morán et al., 2015; Heesen et al., 2016; Janzen et al., 2018). De plus, il a été montré que la surexpression de *PLS3* dans des modèles animaux de SMA (souris, zebrafish et drosophile) permettait de normaliser le défaut de croissance des axones associé à la dégénérescence des motoneurons dans la SMA (Ackermann et al., 2013; Alrafiah et al., 2018; Hosseinibarkooie et al., 2016; Kaifer et al., 2017; Oprea et al., 2008).

Toutefois ces données restent controversées. Une étude a montré que la surexpression de la protéine *PLS3* dès le stade oocytes de souris SMA n'induisait pas d'amélioration du phénotype (McGovern et al., 2015). Bowerman *et al.*, (2009) n'ont pas non plus observé d'amélioration phénotypique associée à des niveaux élevés de *PLS3* suite au *knock-out* de la *Proflin-2* dans leur modèle de souris SMA sévère (Bowerman et al., 2009). Fait intéressant, Kaifer et al. (2017) ont observé des avantages après surexpression de la *PLS3* par l'AAV9 dans des modèles de souris SMA légères, mais pas chez des souris SMA sévères (Kaifer et al., 2017). Ainsi, le débat concernant le potentiel rôle de *PLS3* en tant que modificateur protecteur de la SMA reste ouvert, et des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre par quel(s) mécanisme(s), la surexpression de *PLS3* pourrait diminuer les symptômes associés à la SMA.

- **Neurocalcine delta (*NCALD*)**

Certains ont proposé que la sous-expression du gène de la neurocalcine delta (*NCALD*) soit un modificateur protecteur du phénotype SMA (Riessland et al., 2017). *NCALD* fonctionne comme un capteur de calcium neuronal qui régule négativement l'endocytose. Le *knock-down* hétérozygote de *NCALD* améliore l'endocytose dans les fibroblastes dérivés de patients SMA. Cette diminution d'expression améliore également l'allongement des axones, la maturation

neuromusculaire et la fonction motrice chez différents modèles murins sévères, intermédiaires et légers SMA (Riessland et al., 2017). Une double approche a été évaluée pour traiter la SMA en combinant des ASO augmentant le niveau de SMN et d'autres réduisant le niveau de NCALD dans un modèle des souris SMA sévère (Torres-Benito et al., 2019). Cette étude montre que la combinatoire présente une meilleure efficacité que l'utilisation de l'ASO-SMN seul. Cependant, une autre étude n'a observé aucune association entre NCALD et le phénotype SMA à moins que plusieurs mutations de NCALD ne coïncident pour éventuellement créer un site d'épissage cryptique (Ruhno et al., 2019).

## 5. Structure et fonction de la protéine SMN

### 5.1. Structure de la protéine SMN

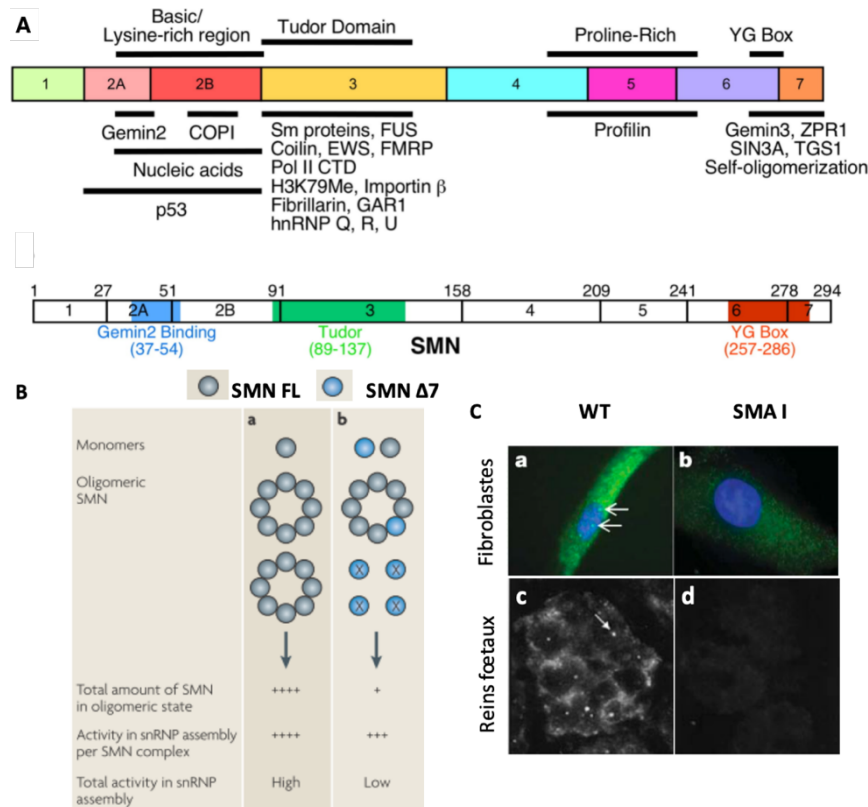
Depuis son identification en 1995, de nombreuses études se sont intéressées à disséquer quelles pouvaient être les fonctions cellulaires jouées par la protéine SMN et en quoi une diminution de son expression peut aboutir à des altérations spécifiques du système neuromusculaire.

Ces études ont permis d'établir que la protéine SMN<sup>FL</sup> est une protéine multifonctionnelle, impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires au niveau cytoplasmique et nucléaire (**Figure 8A**). Son activité repose sur sa capacité d'auto-assemblage via le domaine codé notamment par l'exon 6, alors que l'inclusion de l'exon 7 permet de stabiliser la protéine (Lorson and Androphy, 2000). Des études structurales sur divers composants du complexe SMN, y compris des fragments de SMN lui-même, ont grandement contribué à notre compréhension sur les différents domaines composants la protéine ainsi que leurs fonctions. Pourtant, la structure de la protéine SMN n'a toujours pas été élucidée. En 2015, une étude rapporte la structure 3D, par cristallographie, de la protéine SMN complète mais cette étude a dû être retirée du fait d'erreurs d'interprétation (Weiss et al., 2016). Plusieurs travaux ont néanmoins permis de décrire les différents domaines composant cette protéine de 294 acides aminés (Singh et al., 2017) :

Le domaine TUDOR, nommé ainsi par son homologie de séquence avec la protéine TUDOR de la drosophile, correspond à une partie hydrophobe capable d'interagir avec d'autres protéines possédant des domaines riches en arginine et en glycine telles que les protéines Sm, intervenant dans l'assemblage du spliceosome (Friesen and Dreyfuss, 2000; Sabra et al., 2013; Selenko et al., 2001; Tripsianes et al., 2011). Ce domaine est également décrit comme impliqué dans d'autres fonctions, telles que la localisation nucléaire de SMN par interaction avec la protéine Coiline (Renvoisé et al., 2006; Tapia et al., 2014), ou encore le processus de transcription. En effet, un défaut dans le domaine TUDOR, causé par des mutations observées dans la SMA, a pour conséquence la perturbation de l'action de l'ARN polymérase II qui intervient dans la transcription d'autres facteurs (Zhao et al., 2016).

Le domaine riche en proline est quant à lui situé dans la partie C-terminale. Il intervient d'une part dans la localisation de SMN, lui confère des propriétés d'auto-assemblage et

permet également l'interaction avec la Profiline, protéine impliquée dans la dynamique de l'actine. Bien que la protéine SMN se lie aux deux isoformes de la Profiline, l'interaction avec la Profiline-2 est privilégiée dans le SNC (Giesemann et al., 1999). Il a également été montré que la protéine SMN interagissait avec la voie Rho-Kinase par l'intermédiaire de la Profiline-2a. Ainsi, la perte de SMN *in vitro* aboutit à l'hyper-phosphorylation de la Profiline-2a ce qui pourrait réprimer la croissance des neurites dans les cellules neuronales (Nölle et al., 2011).



**Figure 8 : Description schématique des domaines de la protéine SMN et impact de la mutation sur la capacité d'oligomérisation, la fonction de SMN dans l'assemblage des snRNP et l'épissage.** (A) Représentation schématique de la protéine SMN. (B) La protéine SMN est capable de s'oligomériser sous forme d'un octamère, nécessaire pour l'activité d'assemblage des snRNP. La protéine SMN<sup>Δ7</sup> ne peut pas s'oligomériser mais peut compléter une faible quantité de SMN<sup>FL</sup> et ainsi permettre l'assemblage des snRNP avec une activité moindre. (C) La protéine SMN fonctionnelle est détectée au niveau de structures nucléaires appelées gems, mais est absente dans les échantillons de patients SMA de type I (b-d). *Adapté de (Ebert et al., 2009; Singh et al., 2017).*

Des expériences d'interactions *in vitro* ont montré que la protéine SMN-FL est capable de s'oligomériser alors que la forme SMN<sup>Δ7</sup> en est incapable (Lorson et al., 1998). Cependant, en complément d'une quantité minimale de SMN<sup>FL</sup>, il a été montré que la forme tronquée pouvait participer au phénomène d'oligomérisation, démontrant que l'exon 7 était nécessaire à cet auto-assemblage (**Figure 8B**) (Burghes and Beattie, 2009).

Une fois oligomérisée, SMN est capable d'interagir avec plusieurs complexes moléculaires qui lui confèrent une action plus ou moins directe dans de nombreux processus essentiels à la physiologie cellulaire. En effet, la protéine SMN s'associe avec plusieurs autres

protéines pour former un complexe multi-protéique. Ce complexe est formé par les protéines Gemins 2-8 et Unrip. Les protéines Gemins sont nommées ainsi de par leur localisation dans les gems (leur numéro correspond à l'ordre chronologique de leur découverte) (**Tableau 3**) (Lorson et al., 1998; Otter et al., 2007). Ainsi, la protéine SMN va jouer un rôle dans les processus d'épissage et de traduction de certains gènes, dans le transport et la croissance axonale ou encore dans le maintien et la maturation des jonctions neuromusculaires (NMJ) (Burghes and Beattie, 2009; Eggert et al., 2006; Gabanella et al., 2005; Liu et al., 1997; Martínez-Hernández et al., 2014).

Protéine	Poids moléculaire (kDa)	Localisation	Références
SMN	38	Cytoplasme, noyau, gems	(Lefebvre et al., 1995)
Gemin2	31,5	Cytoplasme, noyau, gems	(Liu et al., 1997; Zhang et al., 2011)
Gemin3	103	Cytoplasme, noyau, gems	(Charroux et al., 1999)
Gemin4	97	Cytoplasme, noyau, gems, nucléoles	(Campbell et al., 2000)
Gemin5	168,5	Cytoplasme, noyau, gems	(Charroux et al., 2000)
Gemin6	15	Cytoplasme, noyau, gems	(Meister et al., 2001)
Gemin7	14,5	Cytoplasme, noyau, gems	(Gubitiz et al., 2002)
Gemin8	28,6	Cytoplasme, noyau, gems	(Pellizzoni et al., 2002)
Unrip	64	Cytoplasme	(Baccon et al., 2002)
			(Carissimi et al., 2005)

**Tableau 3 : Les composants du complexe SMN.** *Adapté de (Li et al., 2014).*

## 5.2. Expression de la protéine SMN en fonction du temps

Des études réalisées chez l'homme et la souris ont révélé que la protéine SMN est fortement exprimée aux premiers stades du développement embryonnaire et foetal. Puis son expression diminue progressivement au cours du développement pour atteindre un niveau d'expression basal au stade adulte (Bergin et al., 1997; Burlet et al., 1998; Jablonka and Sendtner, 2017). Récemment, une étude menée sur des tissus de moelle épinière post-mortem a mis en évidence que les différences d'expression majeures de la protéine SMN entre les patients sains et SMA sont principalement retrouvées au 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> trimestre de gestation, et diminuent significativement 3 mois après la naissance (Ramos et al., 2019). Son niveau protéique diminue au cours des premières semaines postnatales pour être exprimée de façon ubiquitaire chez l'adulte mais avec des niveaux d'expression variable en fonction des tissus. Elle est ainsi retrouvée très exprimée dans le cerveau, le foie, le rein et la moelle épinière, plus modérément dans les muscles squelettiques et cardiaques et faiblement dans les fibroblastes et les lymphocytes (Burlet et al., 1998; Coover et al., 1997; Lefebvre et al., 1997; Young et al., 2000). Des changements de localisation et de phosphorylation modulent également l'activité de cette protéine indépendamment de son niveau d'expression (Fidziańska and Rafalowska, 2002; Gabanella et al., 2005; Giavazzi et al., 2006; Renvoisé et al., 2012).

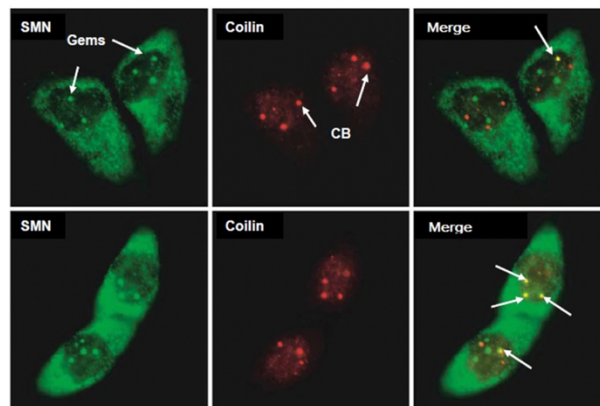


Dans l'ensemble, ces études mettent en lumière l'importance de la temporalité de SMN au cours du développement et ont permis de révéler les périodes critiques au cours desquelles l'expression de SMN doit être restaurée afin d'empêcher l'établissement de défauts irréversibles.

### 5.3. Localisation cellulaire de la protéine SMN

La protéine SMN est principalement localisée au niveau nucléaire, dans lequel elle se retrouve concentrée dans des structures de taille comprise entre 0,1 et 1  $\mu\text{m}$  de diamètre, appelé « gems » (Gemini or coiled bodies). Mais SMN est également présente dans le cytoplasme où sa localisation est diffuse et à plus faible niveau (Lefebvre et al., 1997; Liu and Dreyfuss, 1996; Renvoisé et al., 2006). Dans le noyau de la plupart des tissus adultes, les gems sont retrouvés co-localisés avec les Corps de Cajal (ou Cajal Bodies), structures impliquées dans l'assemblage et la maturation de particules ribonucléoprotéiques (Han et al., 2016; Tapia et al., 2012) (**Figure 9**). Cette co-localisation n'est pas présente dans les tissus fœtaux (Carvalho et al., 1999; Young et al., 2000).

Le nombre de gems contenus dans les noyaux de fibroblastes issus de patients SMA révèle que celui-ci est inversement corrélé à la sévérité clinique (tous types confondus). La baisse d'expression de SMN conduit à la fois à une diminution du nombre de gems par noyau ainsi qu'à une diminution du nombre de cellules possédant des gems (Coovert et al., 1997).

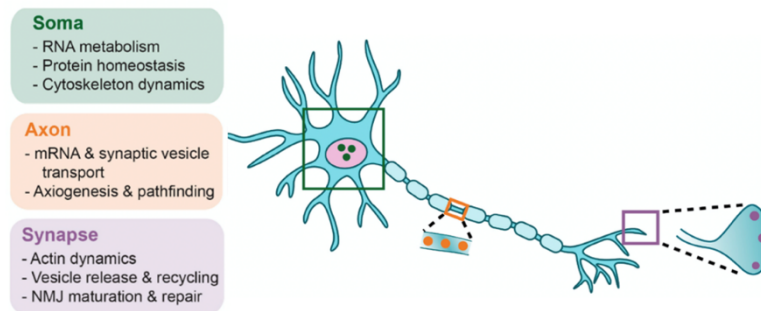


**Figure 9 : Localisation cellulaire de la protéine SMN.** Les gems et les corps de cajal sont indiqués par les flèches. *Adapté de (Gubitz et al., 2004).*

### 5.4. Fonctions de la protéine SMN

Depuis que la protéine SMN a été identifiée comme la cause directe de SMA, des efforts importants ont été déployés pour révéler les fonctions de cette protéine exprimée de manière ubiquitaire au niveau cytoplasmique et nucléaire des cellules. Ces travaux ont démontré que SMN joue un rôle important dans plusieurs voies fondamentales dans l'homéostasie cellulaire, en commençant par son rôle bien caractérisé dans l'assemblage du spliceosome et la biogenèse des ribonucléoprotéines. Des études plus récentes ont montré que SMN est également impliquée dans d'autres processus d'entretien cellulaire, y compris le

trafic d'ARNm et la traduction, la dynamique du cytosquelette et d'endocytose et enfin les processus de mort cellulaire autophagique et apoptotique (**Figure 10**).

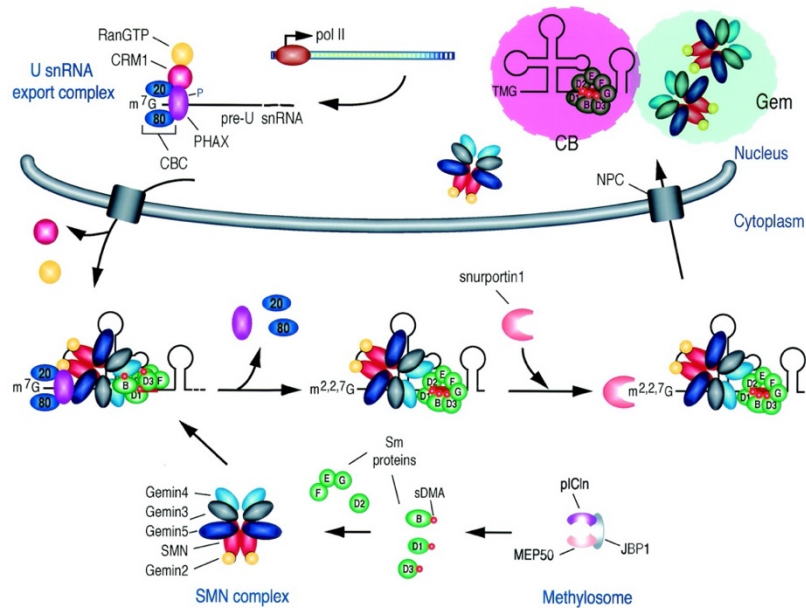


**Figure 10 : Fonctions cellulaires générales de la protéine SMN dans les motoneurones** (Ojala et al., 2021).

- **L'assemblage des ribonucléoprotéines**

L'une des fonctions principales de la protéine SMN, liée à sa localisation dans les corps de Cajal, est son rôle dans l'assemblage des small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs) du spliceosome (Bizarro et al., 2015; Fischer et al., 1997; Gupta et al., 2015; Liu et al., 1997; Massenet et al., 2002; Pellizzoni et al., 2002) (**Figure 11**).

En effet, le complexe SMN constitue une plateforme d'assemblage cytoplasmique qui facilite la fixation des snRNA (small nuclear RNA) riches en Uridine aux protéines Sm (Eggert et al., 2006; Zhang et al., 2011). SMN recrute les protéines Sm riches en arginine et glycine (domaines RG et RGG) grâce à son domaine TUDOR. En parallèle, les UsnRNA (Uridine-rich snRNA) produits dans le noyau sont exportés vers le cytoplasme pour se lier au complexe au niveau de la protéine Gemin5. Il a été démontré le rôle crucial de Gemin2 dans la structure du complexe SMN et l'assemblage à proprement parler du snRNA sur les protéines Sm (Zhang et al., 2011), ainsi que le rôle de PP1 $\gamma$  dans la stabilisation de ce complexe (Renvoisé et al., 2012). Une fois constitué, ce complexe SMN-UsnRNP est entièrement exporté vers le noyau, au niveau des gemes et corps de Cajal où certains snRNP sont essentiels à la reconnaissance de sites d'épissage et à l'élimination des introns. Ce phénomène serait initié par l'interaction de la protéine SMN avec la protéine Coiline (Tapia et al., 2014), et par la phosphorylation de certaines sérine (notamment 28 et 31) de SMN (Husedzinovic et al., 2014). A la fin de la réaction, la protéine SMN participerait au recyclage des UsnRNP et modulerait ainsi la dynamique de ces facteurs dans le spliceosome (**Figure 12**). De ce fait, la protéine SMN n'intervient pas directement dans le processus d'épissage des pré-ARNm, même si elle y joue un rôle majeur dans son bon fonctionnement.



**Figure 11 : Implication de SMN dans l'assemblage des snRNP et dans l'épissage alternatif.**

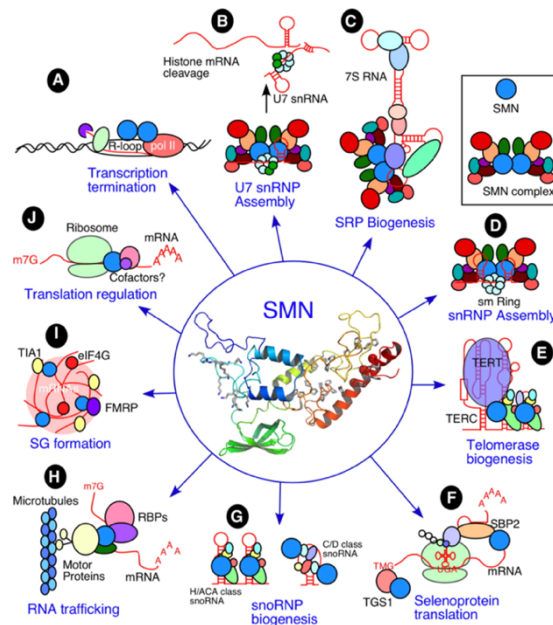
(a) Dans le cytoplasme, 7 protéines Sm se lient à la PICln (chloride conductance regulatory protein) puis sont assemblées et méthylées par les complexes PRMT (proteine arginine méthyltrasferase) 5 et 7, avant d'être libérées. (b) Le complexe SMN formé dans le cytoplasme, contient un nombre indéterminé d'oligomères de la protéine SMN qui recrute les protéines Sm assemblées. (c) Les snRNA sont transcrits dans le noyau et se lient aux protéines de transport PHAX (phosphorylated adaptor for RNA export), CBC (Cap-binding complex), Xpo1 (exportine) et RAN (Ras related Nuclear protein GTP) qui permettent l'export cytoplasmique. (d) Dans le cytoplasme, les snRNAs interagissent avec le complexe SMN via gemin-5, permettent ainsi l'assemblage de protéines Sm. La TGS1 (TrimethylGuanosine Sythétase 1), permet une tri-méthylation des snRNA et la liaison de l'importine et de la snurportine pour être transporté vers le noyau et plus particulièrement vers les corps de Cajal, lieux de l'épissage alternatif. Adapté de (Massenet et al., 2002).

- **Rôle de SMN dans la transcription et traduction**

D'autre part, SMN joue un rôle dans le métabolisme et la biogénèse des snoRNP (Small Nucleolar RNP), impliqués dans la méthylation et la pseudo-uridinilation des ARN ribosomiaux, des ARN de transfert ou des snRNP qui sont essentiels à la régulation de l'expression génique (Eggert et al., 2006; Gubitza et al., 2004; Liu et al., 1997; Meister et al., 2001; Ogawa et al., 2009; Pellizzoni, 2007). Elle est également associée à un complexe de traduction protéique en interaction avec l'hélicase RHA (RNA Helicase A) et l'ARN polymérase II (Pellizzoni et al., 2001) (**Figure 12**). Il a ainsi été montré que SMN régule au niveau traductionnel l'expression de l'arginine méthyltransférase CARM1 (co-activator-associated arginine méthyltransferase 1) et une augmentation anormale de la protéine CARM1 a été observée dans des échantillons de moelle épinière de souris SMA et dans des fibroblastes issus de patients SMA de type I (Sanchez et al., 2016, 2013). Cette régulation est dépendante du recrutement de cofacteurs via son domaine Tudor au niveau des ribosomes.

De plus en plus de preuves indiquent que la protéine SMN est un déterminant clé de la voie de traduction. Parallèlement à son rôle dans le traitement et le tri de l'ARN,

plusieurs travaux soutiennent une implication critique du SMN dans la biogenèse des ribosomes (Gabanella et al., 2016; Lauria et al., 2020; Ottesen et al., 2018). Il a été démontré que la protéine SMN se lie aux protéines ribosomiques (RP) ainsi qu'à leurs transcrits codants, garantissant un niveau approprié de RP synthétisées localement. Ces études ont permis de constater que SMN peut réguler non seulement les composants structurels de la machinerie traductionnelle, mais aussi les facteurs de régulation en amont (Gabanella et al., 2021).



**Figure 12 : Principaux complexes moléculaires dans lesquels SMN est impliquée.** La protéine SMN participe à la formation d'un complexe cytoplasmique qui facilite l'assemblage des snRNP dans le cytoplasme avant de les réimporter dans le noyau vers le spliceosome. Elle participerait au recyclage des UsnRNA en fin de réaction d'épissage. Elle interagit avec l'ARN hélicase A (RHA) et stimule la transcription par l'ARN polymérase II. SMN interagit avec l'ARNm de l'actine  $\beta$  qui est transporté de manière active dans les axones des MN. *Adapté de (Singh et al., 2017).*

- **Transport axonal**

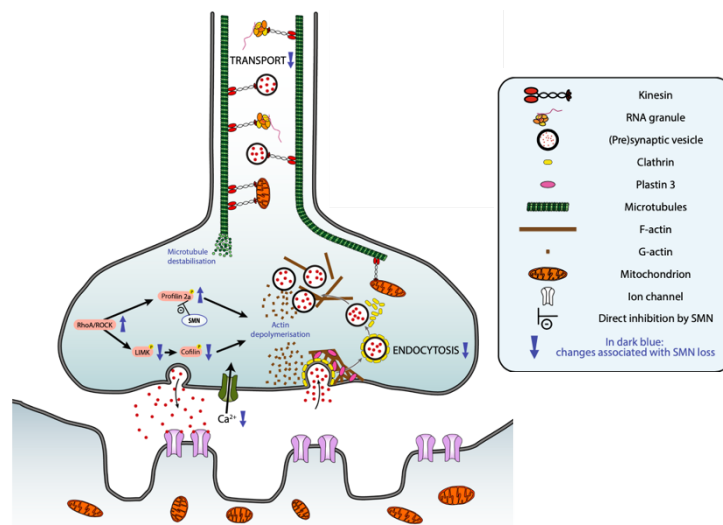
De la même manière, certains éléments permettent de considérer que la protéine SMN est impliquée dans l'assemblage d'autres RNP, lui valant le qualificatif de « Master RNP assembler ». Ainsi, il a été démontré qu'elle était importante pour l'assemblage de certaines protéines LSm (Sm Like proteins) sur les snRNA avec cette fois-ci une localisation essentiellement cytoplasmique (Burghes and Beattie, 2009). Ces complexes ont été détectés dans les dendrites et axones de certains neurones et seraient associés à des phénomènes de stabilité, de dégradation et de transport des ARNm (di Penta et al., 2009).

Il a également été démontré que la protéine SMN interagissait avec les Gemin 2 et 3 dans des granules présentes le long des neurites et au niveau des cônes de croissance (Donlin-Asp et al., 2017; Zhang et al., 2006). Grâce à son domaine riche en proline, SMN interagit avec la profiline 2a qui est impliquée dans la régulation de la dynamique de l'actine et la neurogenèse (Bowerman et al., 2017; Giesemann et al., 1999; Nölle et al., 2011; Rademacher, 2017; Sharma et al., 2005). Cette interaction maintiendrait la dynamique de l'actine permettant la croissance correcte des cônes de croissance des MN.

Plusieurs études, basées sur différents modèles *in vitro* SMA, en sont arrivées à la même conclusion : la protéine SMN participe via son domaine Tudor au transport le long des axones de plusieurs « *RNA binding protein* » (RBPs) comme les protéines KSRP, hnRNPs, HuD et IMP1 (Dombert et al., 2014; Fallini et al., 2014, 2011; Ottesen et al., 2018; Tadesse et al., 2008). Il a été démontré que ces RBPs influenceraient la localisation et la traduction des ARNm Gap43,  $\beta$ -actine, Anxa2 ou encore neuritin/cpg15 (Fallini et al., 2016; Hao et al., 2017; Ottesen et al., 2018; Rihan et al., 2017). Ces complexes se forment par l'association directe entre SMN et les hnRNP (Heterogeneous nuclear RNP) Q et R et permettent la localisation des ARNm dans les axones pour être traduits localement et ainsi participer à la dynamique de polymérisation de l'actine dans les cônes de croissance (**Figure 12**). Une autre équipe a identifié l'interaction de SMN avec la protéine vésiculaire  $\alpha$ -COP suggérant que la protéine SMN pourrait intervenir dans la régulation du transport vésiculaire axonal (Li et al., 2015; Peter et al., 2011). Prises ensemble, ces données suggèrent collectivement que la protéine SMN joue un rôle important dans le transport axonal des ARNm.

- **Autres mécanismes d'action**

Différentes études suggèrent que SMN pourrait également intervenir dans un nombre croissant de domaines de l'homéostasie cellulaire, tels que l'endocytose (**Figure 13**), les processus de renouvellement des protéines de l'autophagie et de la voie ubiquitine-protéasome et la régulation de l'activité mitochondriale.



**Figure 13 : Aperçu schématique des altérations de la dynamique du cytosquelette et de l'endocytose observées suite à un déficit en SMN.** Le schéma met en évidence ces changements au niveau du motoneurone et de la jonction neuromusculaire. Tous les changements associés à la perte de SMN sont représentés en bleu foncé (Chaytow et al., 2018).

- Voie de l'ubiquitine :

Grâce à des analyses protéomiques, il a été découvert que le SMN interagit avec plusieurs composants de la voie de l'ubiquitine, y compris UBA1 et plusieurs ligases E3 (Fuller et al., 2016; Gray et al., 2018). Dans une autre forme de SMA, la SMA lié à l'X, les patients

présentent des symptômes et une espérance de vie comparables aux patients atteints de SMA de type I. Cette forme a été reliée à un hot-spot de mutations situé dans le gène *UBA1* (ubiquitin-like-modifier activating enzyme 1 gene) (Ramser et al., 2008). UBA1 intervient dans les premières étapes de la voie de l'ubiquitination conduisant à la mise en place de la dégradation des protéines par le protéasome. De façon intéressante, il a été montré que des fibroblastes de patients SMA de type I présentaient un taux supérieur de l'enzyme UCHL1 (Ubiquitin Carboxyl-terminal Hydrolase L1) par rapport à des fibroblastes sains (Hsu et al., 2010). Cette enzyme étant directement liée, tout comme UBA1, à la voie d'ubiquitination, il a été suggéré que cette voie de signalisation pouvait intervenir dans la SMA. Des travaux supplémentaires ont permis d'observer une diminution d'expression d'UBA1 dans des modèles sévères de souris et drosophile SMA, ainsi que dans des biopsies musculaires et des motoneurones dérivés de cellules souches pluripotentes issus de patients SMA (Liu and Pfleger, 2013; Powis et al., 2016; Wishart et al., 2014). De plus, la restauration de UBA1 dans ces différents modèles SMA réduit les phénotypes neuromusculaires suggérant le potentiel thérapeutique de cette protéine dans la SMA.

- L'endocytose :

SMN interviendrait également dans la régulation des processus d'endocytose par sa liaison avec la calvéoline, une protéine impliquée dans les processus d'endocytose (Doherty and McMahon, 2009; Pelkmans and Helenius, 2002). Chez *C. Elegans*, la suppression du gène *Smn* conduit à la perte du recyclage des vésicules au niveau de la membrane synaptique, suggérant un arrêt de la maturation des vésicules endocytaires (Dimitriadi et al., 2016). De même, dans un modèle murin sévère de SMA, l'endocytose est perturbée après stimulation musculaire (Hosseini-barkooie et al., 2016).

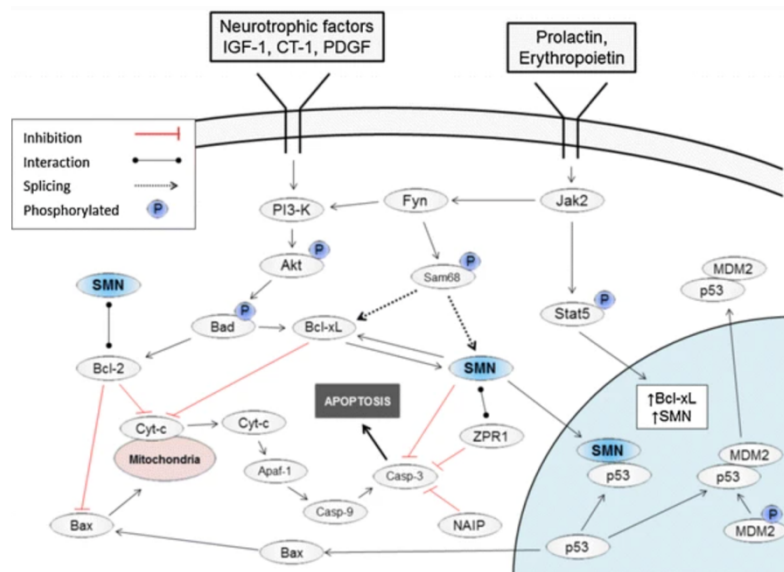
- L'autophagie :

L'autophagie est un mécanisme finement équilibré : une diminution de l'expression des gènes liés à l'autophagie peut conduire à l'accumulation de protéines indésirables tandis que l'autophagie trop active entraîne une augmentation du nombre d'autophagosomes, pouvant conduire à la mort cellulaire. Ces deux mécanismes ont été décrits dans divers modèles d'épuisement de SMN, indiquant un rôle de SMN dans la régulation de l'autophagie. En mesurant l'expression de LC3-II, un marqueur des autophagosomes, il a été montré que le nombre d'autophagosomes est augmenté dans les motoneurones primaires après le *knock-down* de SMN (Garcera et al., 2013). Ce phénotype a aussi été observé *in vivo* dans la moelle épinière d'un modèle murin SMA sévère (Periyakarupiah et al., 2016; Piras et al., 2017).

- Processus apoptotique :

Un ensemble de données montrent que le déficit en SMN induit la mort des cellules par apoptose. En effet, de nombreux régulateurs de survie cellulaire ont été retrouvés dérégulés (**Figure 14**), tels que Bcl-2 (Anderton et al., 2012; Iwahashi et al., 1997; Soler-Botija et al., 2002; Tseng et al., 2016), P53 (Anderton et al., 2013; Simon et al., 2017; Van Alstyne et

al., 2018; Young et al., 2002), ou encore ZPR1 (Ahmad et al., 2012; Gangwani et al., 2001; Jiang et al., 2019).



**Figure 14 : modèle de voies de signalisation dans lesquels SMN est impliquée dans la régulation de l'apoptose. Adapté de (Anderton et al., 2013).**

L'identification des nombreuses fonctions associées à la protéine SMN a été possible en particulier grâce au développement de modèles animaux de la SMA. Néanmoins, pour un certain nombre de ces processus, nous ne connaissons pas aujourd'hui les mécanismes exacts par lesquels la diminution de la protéine SMN aboutit à la perturbation et dégénérescence du système neuromusculaire.

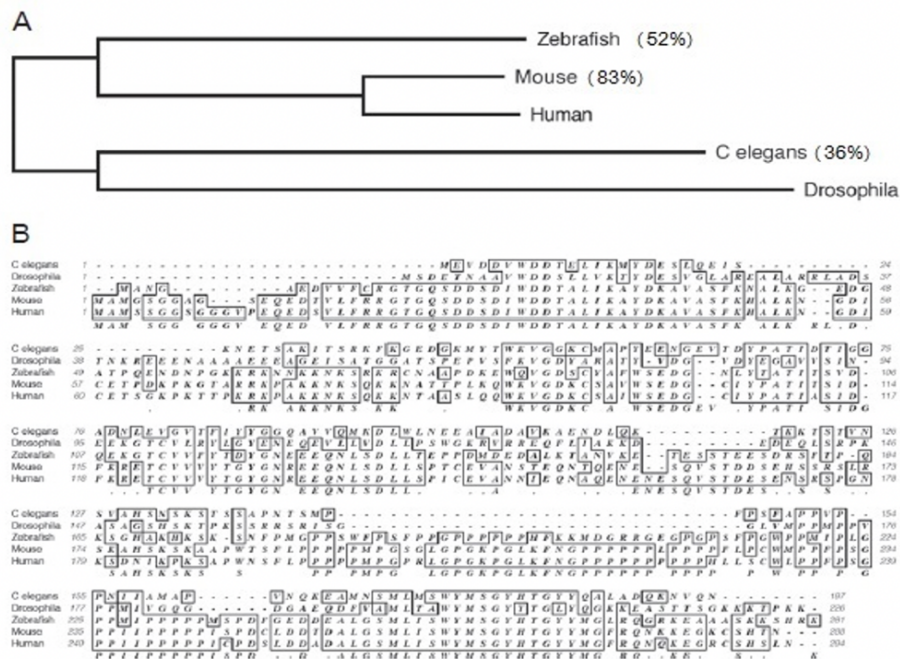
## 6. Modèles d'étude de la SMA

Le développement et la caractérisation de modèles animaux SMA ont conduit à de grands progrès à la fois dans la compréhension des processus physiopathologiques mais également dans l'identification et la validation de thérapeutiques. Comme nous allons le voir, ces modèles présentent toutefois certaines limites, d'où la nécessité de développer des modèles plus ciblés afin d'avancer dans la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires associés à la SMA.

### 6.1. Modèles animaux de la SMA

Le gène *SMN2* étant présent uniquement chez l'homme, le développement de modèles animaux a été particulièrement compliqué. En effet, dans tous les modèles animaux utilisés, la perte homozygote du gène *Smn* conduit à une mort embryonnaire (Chan et al., 2003; Schrank et al., 1997). Les modèles les plus pertinents requièrent donc soit une inactivation conditionnelle (du taux d'expression et/ou dans le temps) du gène *Smn* endogène, soit en compensant partiellement l'inactivation du gène *Smn* par apport transgénique du gène

*SMN2* humain (**Tableau 4**). De plus, suivant l'espèce utilisée, l'homologie de la protéine SMN avec la séquence humaine est plus ou moins élevée, ce qui pourrait potentiellement induire des différences dans les fonctions de la protéine entre les espèces (**Figure 15**).



**Figure 15 : Homologie de séquence de la protéine SMN.** A) Arbre phylogénétique représentant l'homologie des séquences de la protéine SMN en fonction de différentes espèces. B) Alignement de séquence des gènes SMN de différents organismes. Les bases identiques sont entourées. *Adapté de (Bertrand et al., 1999; Edens et al., 2015).*

### 6.1.1 Modèles murins de la SMA

Reproduire l'hétérogénéité de la SMA à travers les modèles murins s'est avérée difficile. En effet, le nombre de copies de *SMN2* humain dans un modèle murin n'entraîne pas une gravité similaire à celle des patients. Par exemple, un patient SMA avec quatre copies du gène *SMN2* présentent des déficits moteurs importants (certains patients SMA de type III) alors que très peu de défauts sont observés dans le modèle murin équivalent (Tsai et al., 2006). Fait intéressant, il semble que le seuil auquel la déplétion en *Smn* provoque un phénotype SMA chez la souris est très étroit, avec un phénomène proche du « *tout ou rien* », où les souris sont soit très affectées, soit ne présentent presque aucun phénotype. Les modèles précliniques les plus utilisés pour la SMA, tels que le modèle murin sévère (*Smn*<sup>-/-</sup> ; *SMN2*), le modèle « Delta 7 » (*Smn*<sup>-/-</sup> ; *SMN2* ; *SMN*<sup>Δ7/Δ7</sup>) et le modèle « taïwanais » (avec deux copies de *SMN2*), correspondent à des modèles murins sévères avec une durée de vie inférieure à 14 jours (Hsieh-Li et al., 2000; Le et al., 2005; Monani et al., 2000). Le modèle *Smn2B*<sup>-/-</sup> est plus modéré avec une durée de vie des animaux de 25 jours en moyenne (Bowerman et al., 2012; Eshraghi et al., 2016). Ce modèle est basé sur une substitution de 3 paires de bases dans la région de l'ESE de l'exon 7 de *Smn* (Bowerman et al., 2012; DiDonato et al., 2001; Hammond et al., 2010). Bien que des modèles de SMA moins sévère aient été générés (**Tableau 4**) (Bogdanik et al., 2015; Cobb et al., 2013; Gladman et al., 2010; Monani et



al., 2003; Osborne et al., 2012; Workman et al., 2009), leur utilisation a été limitée, car beaucoup n'ont montré que peu de caractéristiques de la SMA.

Néanmoins, un nouveau modèle de souris SMA modéré ( $Smn^{2B/-}$  ;  $SMN2^{+/-}$ ) a récemment été généré, en croisant des souris  $Smn^{-/-}$  ;  $SMN2$  et  $Smn^{2B/2B}$  (Deguise et al., 2020). Bien que ces souris ne présentent pas de défaut de survie, leur poids est néanmoins réduit, avec une faiblesse motrice, un déficit de transmission électrophysiologique, des défauts NMJ et une atrophie musculaire. Des déficits électrophysiologiques démontrent le potentiel rôle du muscle dans la SMA. L'utilisation de ce modèle pourrait permettre de comprendre les changements moléculaires pathogènes les plus sensibles dans les motoneurons et les muscles et d'étudier les effets de l'épuisement du SMN au cours du vieillissement.

Sévérité du modèle, type de SMA	Génotype	Survie moyenne	Ref.
N/A	$Smn^{-/-}$	Létal durant l'embryogénèse	Schrank et al., 1997
Très sévère (SMA-0)	$Smn^{-/-}$ ; $SMN2$ (89Ahmb) <sup>+/+</sup>	5 jours	Monani et al., 2000
	$Smn^{-/-}$ ; $SMN1^{VDQNOKE}$ ; $SMN2^{tg/tg}$	6,5 jours	Workman et al., 2009
Sévère (SMA I)	$Smn^{-/-}$ ; $SMN2$ (2Hung) <sup>+/+</sup>	10 jours	Hsieh-Li et al., 2000
	$Smn^{-/-}$ ; $SMN2^{+/-}$ ; $SMN1$ (A111G) <sup>+/-</sup>	8,2 jours	Workman et al., 2009
	$Smn1^{-/-}$ ; $SMN2^{tg/tg}$ ; $SMN\Delta7^{tg/tg}$	13 jours	Le et al., 2005
	$Smn^{+/-}$ ; $SMN2(N11)^{+/-}$ ; $SMN2(N46)^{+/-}$	15 jours	Michaud et al., 2010
Sévère (SMA I-II)	$Smn^{2B/-}$	28 jours	Bowerman et al., 2012
Modéré (SMA II-III)	$Smn^{-/-}$ ; $SMN2^{tg/tg}$ ; $SMN1^{A2G}$	227 jours	Monani et al., 2003
	$Smn1^{tm5(Smn1/SMN2)Mrph}$		Osborne et al., 2012
	$Smn^{+/-}$ ; $Gemin2^{+/-}$	Adult	Jablonka et al., 2002
	$Smn^{2B/-}$ ; $SMN2^{+/-}$		Deguise et al., 2020

**Tableau 4 : Modèles murins de la SMA.** Adapté de (Deguise et al., 2020).

- **Modèles murins conditionnels de SMA**

Enfin, plusieurs modèles ont été créés pour permettre d'étudier la fonction de *Smn* dans le développement et le maintien de certains tissus spécifiques. L'obtention de ces modèles a été rendue possible par l'ajout de séquences de recombinaison F7 autour de l'exon 7 du gène *Smn* (Frugier et al., 2000). Ces animaux peuvent ensuite être croisés avec d'autres modèles murins exprimant une enzyme de recombinaison Cre régulée par un promoteur tissu spécifique et éventuellement inductible par l'administration de tamoxifène. Les phénotypes des différents modèles obtenus seront décrits dans la partie concernant les phénotypes tissulaires observés dans la SMA. L'utilisation de ces modèles inductibles a permis de montrer que l'expression de *Smn* durant une fenêtre précise du développement (de E13 à 28 jours postnataux) permet d'allonger considérablement la durée de vie des souris  $Smn^{-/-}$  ;  $SMN2^{+/-}$  ;  $SMN\Delta7^{+/-}$  autour de 130 jours (Le et al., 2005).

La stratégie de recombinaison Cre-LoxP a en particulier permis d'étudier l'effet de la délétion de l'exon 7 de *Smn* spécifiquement dans le système nerveux et musculaire. L'utilisation du promoteur HSA permet la délétion de l'exon7 de *Smn* spécifiquement dans les

cellules mésodermiques (dont les muscles squelettiques) et entraîne l'apparition d'un phénotype sévère de dystrophie musculaire, menant à une paralysie musculaire en 3 semaines (Cifuentes-Diaz et al., 2001). Cependant, lorsque le niveau de SMN-FL reste préservé dans les cellules satellites des phénomènes de régénération musculaires permettent de limiter la sévérité des phénotypes myogéniques et moteurs. Bien que ces animaux développent également une dystrophie musculaire, leur durée de vie est considérablement allongée (Nicole et al., 2003). Le promoteur NSE (Neuron Specific Enolase) a été utilisé pour induire la délétion de SmnF7 dans les neurones de manière aspécifique et a révélé la mise en place d'un phénotype SMA de sévérité moyenne. Les résultats démontrent des signes précoces de déficits moteurs et une atrophie musculaire caractéristique d'une dénervation (Ferri et al., 2004; Frugier et al., 2000).

Récemment, une nouvelle stratégie a été développée afin de dépléter spécifiquement SMN dans les muscles à l'aide d'une recombinase Cre modifiée, la MyoD-iCre (Kim et al., 2020). Ce modèle de souris a permis de démontrer que plus le niveau de protéine Smn dans le muscle est faible et plus les déficits moteurs, les défauts de NMJ et de régénération musculaire sont importants et apparaissent rapidement. Ces découvertes récentes ont mis en évidence le rôle fondamental de la protéine SMN dans le muscle et sa pertinence dans la pathogenèse de la SMA.

- **Modèles murins pharmacologiques**

Dans le but de développer des modèles murins présentant un phénotype SMA modéré, des souris pharmacologiques ont également été générées à partir de modèles sévères SMA en utilisant de faibles doses d'agents induisant la protéine Smn (**Tableau 5**). Cependant, ceux-ci ne représentent pas l'expression physiologique normale de Smn au cours du développement ou à l'âge adulte. De plus, de nombreux rapports ont montré que des différences moléculaires sont présentes lors de la comparaison de modèles de souris SMA avec des tissus de patients SMA (Deguise et al., 2016; Millino et al., 2009). Ainsi, les modèles de souris SMA actuels ne permettent pas un suivi expérimental sur du long terme compte tenu de leur courte durée de vie.

Mouse model	Lifespan	Neuronal pathology	NMJ pathology	Muscle size	Motor function	Extra-neuronal findings	Tail length	Ref.
Taiwanese + PMO25 (10 µg/g)	22 jours	MN: no change	↓ innervation ↓ size	↓	↓	N/A	N/A	(Zhou et al., 2015)
Taiwanese + PMO25 (10 µg/g) (q2wks)	~92 jours	MN: no change	↓ size	↓	No change	N/A	None	(Zhou et al., 2015)
<i>Smn</i> Δ7 + 0.1 mg/kg SMN-C3	~28 jours	Axonal loss MN: N/A	↓ innervation	↓	↓	N/A	Shorter tails	(Feng et al., 2016; Long et al., 2019)
<i>Smn</i> Δ7 + 3 mg/kg SMN-C3	Near normal	No axonal loss MN: N/A	↓ innervation	↓ in some muscles	↓	N/A	Shorter tails	(Feng et al., 2016; Long et al., 2019)
Taiwanese (4 copies) + ASO-20-37 (ICV)	~90-130 jours	MN: ↓ or normal MN size: ↓	Varicosities, Endplate fragmentation No denervation	Normal	↓	No heart or liver abnormalities	N/A	(Sahashi et al., 2013)
Taiwanese (4 copies) + ASO-20-37 (IP)	~90 jours	MN: ↓	N/A	N/A	No change	<i>Heart</i> : LV size reduction, IVS hypertrophy <i>Liver</i> : necrosis, degeneration, regeneration	N/A	(Sahashi et al., 2013)

Abréviations : N/A – non renseigné, MN – motoneurones, NMJ – neuromuscular junction, IVS – interventricular septum, PMO -, q2wks – toutes les 2 semaines, ICV – intracérébroventriculaire, IP – intrapéritoneal, LV – left ventricle.

**Tableau 5 : Modèles murins pharmacologiques de SMA. Adapté de (Deguise et al., 2020).**

### 6.1.2 Les autres modèles *in vivo* de la SMA

Parallèlement aux modèles de souris, d'autres modèles animaux SMA ont été créés à partir d'organismes phylogénétiquement moins évolués afin de faciliter l'étude de certains phénomènes et mécanismes moléculaires.

- ***Drosophila Mélanogaster***

Un modèle largement utilisé a été la drosophile (McGurk et al., 2015). Le gène *Smn* de la drosophile code une protéine *Smn* homologue à 41% avec la protéine humaine. Plusieurs modèles ont été générés en invalidant le gène *Smn* par un ARN double brin (dsARN) (Rajendra et al., 2007), en utilisant un système GAL4-inductible (Miguel-Aliaga et al., 2000) ou en générant des mutations ponctuelles sur le gène *dSmn* (Chan et al., 2003). L'utilisation de ces modèles drosophiles ont également permis d'identifier toute une liste de phénotypes associés à la diminution d'expression de *Smn* tels que la diminution des courants excitateurs post-synaptiques au niveau des jonctions neuromusculaires, la désorganisation des boutons synaptiques, la perte des récepteurs aux glutamates, les défauts d'arborisation des MNs et l'incapacité de former des filaments fins d'actine dans les muscles (Chan et al., 2003; Chang et al., 2008; Rajendra et al., 2007; Spring et al., 2019). L'étude du modèle Drosophile a également permis de confirmer et d'identifier des fonctions à la protéine *dSmn*, comme un régulateur de l'expression du récepteur du FGF (Sen et al., 2011), ou dans la prolifération et la différenciation cellulaire (Aquilina and Cauchi, 2018; Grice and Liu, 2011).

D'autre part, un modèle Drosophile plus récent a été développé en insérant le minigène rapporteur *SMN2* humain, fusionné à la luciférase, afin d'obtenir facilement l'inclusion de l'exon 7 pendant le processus d'épissage de *SMN2*. Ce modèle peu coûteux a permis de cribler rapidement des milliers de composés et d'en identifier une dizaine, dont la Moxifloxacine, permettant d'augmenter les niveaux de protéines SMN-FL (Konieczny and Artero, 2020). Sur la base de ce travail, une collaboration s'est montée avec l'équipe du Pr. Ruben Artero dans le but de valider ces composés dans des modèles *in vitro* humain SMA.

- **Poisson zèbre**

L'organisation relativement simple de son système neuromusculaire rend le poisson-zèbre très utilisé pour des applications de modélisation de maladies neuromusculaires. Les premiers modèles de poisson-zèbre SMA, dont la protéine *Smn* est homologue à environ 50% avec la protéine humaine, ont été créés en utilisant des morpholinos anti-sens spécifiques de *Smn* introduits dans des embryons très précoces (1 à 4 cellules) (Hao et al., 2013). Différents phénotypes, tels que la faiblesse musculaire et la désorganisation des jonctions neuromusculaires, sont retrouvés dans ce modèle. Ces défauts peuvent être partiellement restaurés par réintroduction de mRNA codant la protéine SMN-FL et non par la forme tronquée SMN $\Delta$ 7. De façon intéressante, ce modèle a permis d'établir que le défaut du développement du système neuromusculaire était la première conséquence phénotypique de la réduction de *Smn*, avant même l'apparition du phénotype de mort des motoneurones (McWhorter et al., 2003). Ces dernières années, la création d'un nouveau modèle à partir d'un

modèle  $Smn^{-/-}$ , dans lequel la copie humaine de *SMN2* a été réintroduite, démontre que SMN est épissé de la même manière chez le poisson, l'homme et la souris, suggérant un mécanisme très conservé au cours de l'évolution (Hao et al., 2011).

- **Caenorhabditis Elegans**

Bien que les nématodes et les humains soient éloignés sur le plan de l'évolution, ils partagent génétiquement un degré élevé de conservation, et *C. elegans* a été largement utilisé pour modéliser de nombreux aspects de la neurodégénérescence associée à la diminution de l'expression de *smn* (Duronio et al., 2017). Les gènes humains *SMN1* et *SMN2* ont un seul orthologue chez les nématodes, nommé *smn-1* codant une protéine dont l'homologie n'est que de 36% à la protéine humaine (Bertrand et al. 1999 ; Owen et al., 2000). *C. elegans* a été utilisé pour étudier les fonctions *in vivo* de la protéine *smn-1* et a révélé des défauts de la voie endocytaire (Dimitriadi et al., 2016, 2013, 2010; Gao et al., 2014). L'utilisation de ce modèle a permis d'identifier 6 composés présentant un certain intérêt thérapeutique même si pour le moment aucun n'a abouti (Briese et al., 2009; Sleight et al., 2011). Ces composés améliorent au moins l'un des phénotypes observés dans les modèles SMA de *C. elegans* : les défauts de mobilité lors de la nage et de fréquence de ponte.

Bien que ces modèles puissent présenter des phénotypes très différents de ce qui est observé dans les modèles murins et les patients SMA, ces modèles ont été décrits comme étant utiles pour l'identification de nouvelles pistes thérapeutiques et sont ainsi susceptibles d'avoir des avantages significatifs quant à leur faible coût.

- **Les grands modèles animaux**

Des initiatives ont également été lancées pour développer de grands modèles animaux pour la SMA, en particulier pour l'évaluation de l'administration et de la non-toxicité des thérapeutiques qui étaient en développement clinique. Ainsi, un modèle porcin de SMA a été généré par l'administration intrathécale d'un scAAV9 contenant un shRNA dirigé contre le gène porcin SMN (pSMN) (Duque et al., 2015). L'extinction de l'ARNm de pSMN médiée par scAAV9 a entraîné une dénervation, une faiblesse et une dégénérescence des motoneurons et des axones de la racine ventrale. L'administration ultérieure de l'ADNc du SMN humain via scAAV9 a considérablement diminué la progression des défauts dans ce modèle et d'autant plus qu'il est administré précocement après le *knock-down* de pSMN.

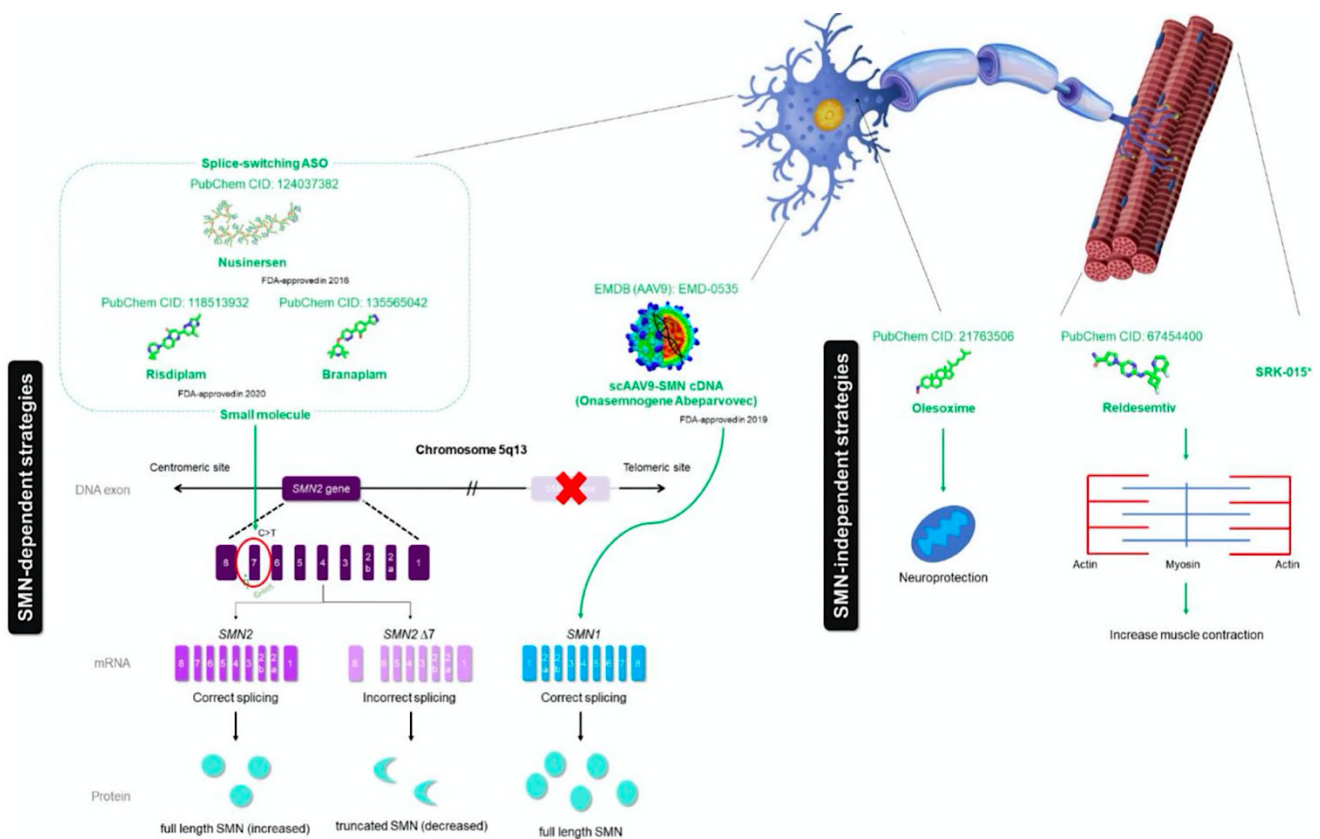
Bien que l'ensemble de ces données démontre que la SMA est due à une diminution d'expression de la protéine ubiquitaire SMN, les mécanismes physiopathologiques restent encore mal compris et plusieurs hypothèses mécanistiques ont été proposées. Une grande majorité de nos connaissances concernant SMA provient de l'étude des différents modèles animaux présentés ci-dessus. Nous pouvons néanmoins nous demander si les différents modèles *in vivo* décrits ci-dessus peuvent réellement être prédictifs des effets chez l'homme, en raison des différences inhérentes à la fonction cellulaire propre à l'espèce.

## 6.2. Modèles cellulaires de la SMA

L'incapacité d'étudier directement les neurones chez les personnes atteintes d'un trouble neurodégénératif tel que la SMA a été un obstacle majeur à la compréhension des mécanismes pathologiques de base, en particulier ceux qui surviennent tôt dans le processus de la maladie. Les développements récents de la technologie des cellules souches ont considérablement révolutionné la gamme de modèles cellulaires disponibles dans la recherche sur les maladies des motoneurones en permettant l'observation directe des mécanismes pathologiques dans les neurones dérivés de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) obtenues à partir de fibroblastes dérivés d'individus affectés. La SMA a été le premier trouble neurodégénératif dans lequel un phénotype pertinent pour la maladie a été démontré dans les motoneurones dérivés des iPSC (Ebert et al., 2009). D'autres modèles, dérivés de cellules souches pluripotentes humaines, ont émergé ces dernières années et seront présentés dans le chapitre III, dans la partie « Modélisation pathologique de la SMA ».

## 7. **Stratégies thérapeutiques de la SMA**

Depuis ces 10 dernières années, le domaine de la SMA a considérablement évolué avec l'identification de stratégies thérapeutiques prometteuses conduisant aux premiers succès thérapeutiques. Aujourd'hui, trois médicaments approuvés par la FDA (Food Drug Administration) et l'EMA (European Medicines Agency) sont disponibles sur le marché pour le traitement de la SMA. Ces thérapies visent toutes à restaurer le niveau de SMN : le Spinraza (Nusinersen, de Biogen) et l'Evrysdi (Risdiplam, de Genentech, filiale de Roche) ciblent l'inclusion de l'exon 7 du gène *SMN2* alors que le Zolgensma (onasemnogene abeparvovec-xioi, de Novartis) vise le remplacement direct du gène *SMN1*. Bien que ces thérapies basées sur le niveau de SMN restent à la pointe des stratégies de traitement de la SMA, tous les patients ne bénéficient pas d'un soulagement complet des symptômes. Ainsi, d'autres stratégies thérapeutiques indépendantes de SMN, ciblant un large panel de processus affectés, sont également explorées (**Figure 16**). Idéalement, ces stratégies thérapeutiques seront disponibles pour les patients de tout le spectre de la SMA et pourront être utilisés en combinaison avec des approches dépendantes de la SMN.



**Figure 16 : Stratégies thérapeutiques actuelles pour la SMA.** Les trois médicaments approuvés par la FDA (nusinersen, onasemnogene abeparovect et risdiplam) et des médicaments en cours d'essais cliniques (branaplam, olesoxime, reldesemtiv et SRK-015). *Adapté de (Chong et al., 2021).*

## 7.1. Stratégies dépendantes de SMN

### 7.1.1. *Stimulation de l'expression du gène SMN par le gène SMN2*

Comme vu précédemment, tous les patients atteints de la SMA possèdent au moins une copie du gène *SMN2* capable de produire la protéine SMN complète et fonctionnelle mais en faible quantité (**Figure 17A**). Corriger l'épissage de *SMN2*, en vue d'augmenter la quantité de protéine SMN pleine longueur produite, a donc été une voie très explorée.

- **Oligonucléotide anti-sens**

En décembre 2016, un premier traitement révolutionnaire pour la SMA a été approuvé par la FDA. Il s'agit d'un oligonucléotide anti-sens (ASO) commercialisé par Biogen sous le nom de Spinraza (Nusinersen). Son mécanisme d'action consiste à augmenter l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits *SMN2* lors de l'épissage du pré-ARNm, conduisant à augmenter la proportion de protéine SMN pleine longueur et fonctionnelle (**Figure 17B**) (Hua et al., 2010). L'ASO nusinersen va se lier spécifiquement au site d'épissage intronique silencieux N1 (ISS-N1) présent dans l'intron 7 de l'ARNm de *SMN2*, qui est un inhibiteur majeur régulant l'épissage de l'exon 7. L'inhibition d'ISS-N1 entraîne l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits *SMN2* matures et augmente ainsi le rapport de protéine SMN pleine longueur (Singh et al.,

2015, 2017).

La preuve de l'efficacité de ce type de construction a été apportée en montrant une augmentation de la protéine SMN dans des fibroblastes de patients puis dans différents modèles animaux (Hua et al., 2011, 2008; Passini et al., 2011; Skordis et al., 2003). Sur la base de ces résultats prometteurs, des essais cliniques engagés par la société Isis Pharmaceuticals (en collaboration avec Biogen Idec), avec la molécule rebaptisée ISI-SMNRx (Rigo et al., 2012), ont montré l'amélioration des scores moteurs, l'augmentation des potentiels d'action musculaires et la diminution du nombre de patients ventilés (Chiriboga, 2017; Finkel et al., 2016). En 2016 la FDA, puis en 2017 l'EMA ont approuvé le nusinersen comme étant le premier traitement de la SMA (Scoto et al., 2017). Il est aujourd'hui disponible dans plus de 40 pays. En raison de son incapacité à traverser la barrière hémato-encéphalique, l'administration du Nusinersen (12 mg) se fait par injection intrathécale selon le protocole suivant : 4 doses à 0, 2, 4 et 9 semaines puis une dose tous les 4 mois (EMA/736370/2017). Néanmoins, la fréquence, la voie d'administration et le fait que beaucoup de patients ne peuvent pas subir de ponction lombaire sont des freins à l'utilisation de ce traitement.

Un rapport intermédiaire de l'étude NURTURE qui a recruté et traité des patients atteints de SMA de type I et II, pendant la petite enfance alors qu'ils étaient pré-symptomatiques, illustre l'importance d'un traitement avec le nusinersen, le plus tôt possible (De Vivo et al., 2019). Les nourrissons inclus dans NURTURE étaient âgés de  $\leq 6$  semaines à la première dose et, sur la base de la concordance attendue du phénotype avec un ou plusieurs frères et sœurs affectés, devaient avoir une SMA de type I ou II. Les résultats de l'étude montrent que les bénéfices du traitement ont dépassé ceux observés lorsque le traitement est initié pendant la période symptomatique. Collectivement, ces résultats soulignent la nécessité d'un dépistage néonatal précoce de la SMA et de l'instauration d'un traitement dès que possible.

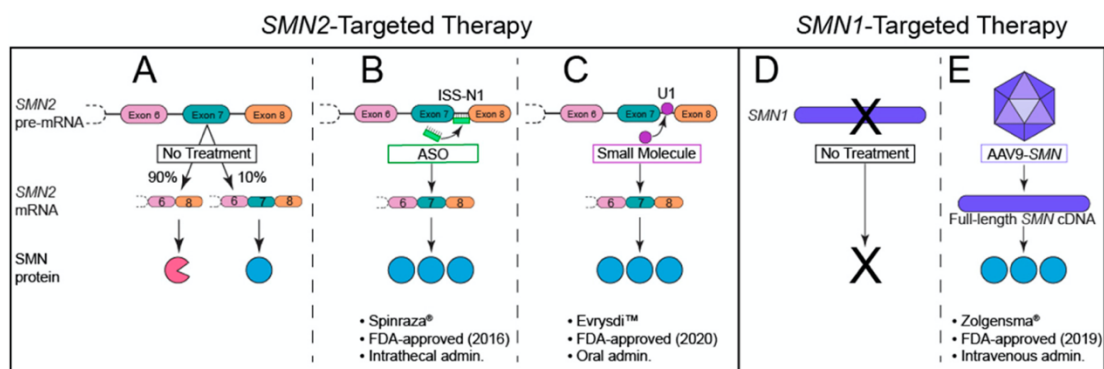


Figure 17 : Traitement dépendant de SMN approuvés par la FDA pour la SMA (Ojala et al., 2021).

- **Petites molécules**

D'autres approches visant à corriger l'épissage de SMN2 ont également été à l'étude, comme les petites molécules qui présentent l'avantage d'être administrables par voie orale. SMN-C1 correspond à la première petite molécule identifiée par screening par PTC therapeutics et optimisée ensuite en collaboration avec Hoffmann-La Roche (Naryshkin et al.,

2014). Les études précliniques sur les souris SMN $\Delta$ 7 (SMA sévère) ont montré une augmentation systémique de la protéine SMN et une amélioration des phénotypes neuromusculaires (Feng et al., 2016; Naryshkin et al., 2014). Dès 2015, ces résultats ont permis de lancer plusieurs essais cliniques avec le RG7916 et du RG7800 chimiquement proches du SMN-C1.

L'effet du RG7916 a d'abord été évalué chez des patients SMA de type I (MOONFISH, NCT02240355, phase I terminée en juillet 2015) puis chez des patients SMA de type I et de type II/III (FIREFISH, NCT02913482, phase II-III, fin estimée 2020 ; SUNFISH, NCT02908685 phase II-III, fin 2020) (Ratni et al., 2018; Scoto et al., 2017). Les résultats de ces études montrent un effet bénéfique du traitement dans une large population d'enfants, d'adolescents et d'adultes, préservant la fonction motrice pour les patients atteints de SMA de type II/III. Récemment (7 août 2020), le risdiplam, anciennement connu sous le nom de RG7916 (Nom commercial : Evrysdi) a été approuvé par la FDA en tant que premier médicament oral pour les patients atteints de SMA (**Figure 17C**). Cependant, il est associé à certains effets secondaires, notamment fièvre, diarrhée, éruption cutanée, infections des voies respiratoires supérieures, pneumonie, constipation et vomissements selon les essais cliniques (FIREFISH pour les nourrissons âgés de 2 à 7 mois et SUNFISH pour les enfants et les adultes âgés de 2 à 25 ans).

D'autre part, les résultats précliniques obtenus sur la seconde molécule, RG7800, développée par le laboratoire Roche, sont plus modestes que ceux obtenus initialement lors de l'essai clinique initié en 2015 (Phase I, NCT02268552). Le développement du RG7800 a dû être stoppé pour cause d'effets indésirables lors des essais précliniques (Palacino et al., 2015; Scoto et al., 2017).

Une autre petite molécule, le branaplam (**Tableau 6**), développé par Novartis Pharmaceuticals, également connu sous le nom de LMI070, agit de manière similaire au risdiplam et permet d'améliorer la concentration en protéine SMN en corrigeant le défaut d'épissage dans le gène *SMN2* (Palacino et al., 2015; Shorrock et al., 2018). Un essai ouvert de phase I/II (NCT02268552) évaluant l'efficacité du branaplam, administré une fois par semaine, chez 40 bébés atteints de SMA de type I avait été suspendu pendant deux ans en raison de problèmes de sécurité identifiés dans les études animales. Après avoir repris en juillet 2019, Novartis a finalement décidé d'arrêter le développement clinique du branaplam pour la SMA. Le branaplam est maintenant développé et a récemment été approuvé par la FDA (décembre 2021) pour le traitement de la maladie de Huntington, une maladie neurodégénérative génétique rare.

D'autres criblages ont identifié que la flunarizine, un bloqueur des canaux calciques, pouvait modifier les événements d'épissage dans les cellules HeLa, y compris la rétention d'intron dans SMN (Younis et al., 2010). Cela a été confirmé dans un autre modèle de fibroblastes de patients atteints de SMA, où la flunarizine a augmenté la localisation de la protéine SMN dans les corps de Cajal et a amélioré la survie des motoneurones dans un modèle de souris SMA (Sapaly et al., 2018).



Drug Name	Mechanism of Action	Route of Administration	Clinical Trial Stages	Effects of Drugs	Type of SMA	Sponsor
<b>Branaplam</b> (LMI070)	SMN2 splicing modifier	Oral	II	N/A	Type I	Novartis
<b>Reldesemtiv</b> (CK-2127107)	Fast skeletal muscle troponin activator (FSTA)	Oral	II	Mild improvement in the six-minute walk test after 4/8 weeks of treatment	Type II/III/IV	Cytokinetics, Astellas
<b>SRK-015</b>	Myostatin inhibitor	Intravenous (IV) injection	II (TOPAZ)	Positive results in animal model	Type II/III	Scholar Rock

**Tableau 6 : Stratégies thérapeutiques de la SMA au stade de l'essai clinique.** *Adapté de (Chong et al., 2021).*

### 7.1.2. Remplacement du gène SMN1

Ces premières stratégies visent toutes à augmenter le niveau de SMN en ciblant le gène *SMN2*. Une stratégie alternative a également été étudiée en parallèle par plusieurs équipes, il s'agit de la thérapie génique dont le but est de remplacer le gène *SMN1* déficient (**Figure 17D,E**). La première démonstration du bénéfice de la réintroduction du gène *SMN1* a été effectuée dans un modèle murin SMA, en 2010, par l'équipe du docteur Kaspar. L'ADN complémentaire (ADNc) de *SMN1* a été introduit dans un adénovirus associé auto-complémenté de sérotype 9 (scAAV9) pour être ensuite injecté chez la souris. L'injection de l'AAV9-SMN en intraveineuse de ces animaux permet la restauration du niveau de SMN dans le cerveau, les motoneurones mais également dans les muscles squelettiques (Foust et al., 2010). D'autres travaux ont confirmé ces résultats, y compris sur d'autres modèles animaux SMA, tel que le cochon (Bevan et al., 2010; Dominguez et al., 2011; Duque et al., 2015; Valori et al., 2010). L'ensemble de ces résultats ont permis le lancement d'un essai clinique pour les patients SMA de type I en avril 2014 par la société AveXis (Mendell et al., 2017). Ce tout premier essai clinique de thérapie génique pour la SMA rapporte que sur les 15 patients âgés de moins de 6 mois inclus, tous ont passé la médiane d'âge sans ventilation, et ont survécu plus de 20 mois (8% des patients SMA de type I passent normalement cet âge sans traitement). En parallèle d'autres essais cliniques de phase II et III ont été menés, pour finalement aboutir en 2019, à l'autorisation de mise sur le marché par la FDA de l'onasemnogene abeparvovec (anciennement AVXS-101), sous le nom commercial Zolgensma, en tant que deuxième traitement pour la SMA et plus particulièrement pour les patients âgés de moins de 2 ans atteints de SMA de type I. Avec une administration intraveineuse (IV) unique, l'AAV9 traverse la barrière hémato-encéphalique et délivre une copie du gène *SMN1* capable d'atteindre les cellules des patients et permettant la production de la protéine SMN. De plus, le transgène *SMN1* ainsi que le promoteur synthétique constitué par l'AAV9, jouent un rôle important pour le maintien de la production de protéines SMN à long terme.

Alors que ces trois traitements ont considérablement changé le domaine de la SMA, certaines limites ont cependant été mises en évidence : les effets secondaires (dans le cas du nusinersen), les effets à long terme ou encore le coût de ces thérapies (**Tableau 7**). L'administration du nusinersen, par injection intrathécale, est difficile et nécessite un

personnel qualifié et une technique sophistiquée, en particulier pour les patients souffrant déjà de scoliose (Song et al., 2020). Pour la thérapie génique, la prévalence héréditaire des anticorps neutralisants d'origine maternelle (bien que potentiellement transitoire) dirigés contre l'AAV9 peut restreindre l'utilisation de la thérapie génique chez une minorité de personnes atteintes de SMA en raison du risque de rendre le vecteur viral inefficace (Sumner and Crawford, 2018) (Sumner et Crawford, 2018). De plus, des résultats récents obtenus dans des modèles murins SMA suggèrent que la surexpression à long terme de SMN médiée par l'AAV9 induirait un dysfonctionnement moteur d'apparition tardive (Van Alstyne et al., 2021). Une autre considération doit être accordée au prix élevé de ces produits thérapeutiques qui a fait l'objet d'une large couverture médiatique. Au cours de la première année de traitement, le nusinersen est estimé à 750 000 \$ puis à 375 000 \$ par an pour les doses d'entretien recommandées (Wurster et al., 2019; Zuluaga-Sanchez et al., 2019). L'onasemnogene abeparvovec coûte quant à lui 2,1 millions de dollars pour une dose unique, plaçant ce médicament comme le plus cher au monde. Enfin, le coût du médicament le plus récemment approuvé par la FDA, le risdiplam, est estimé à environ 340 000 \$ par an. Comme toutes ces thérapies sont relativement nouvelles, il n'y a pas d'études sur leurs effets à long terme.

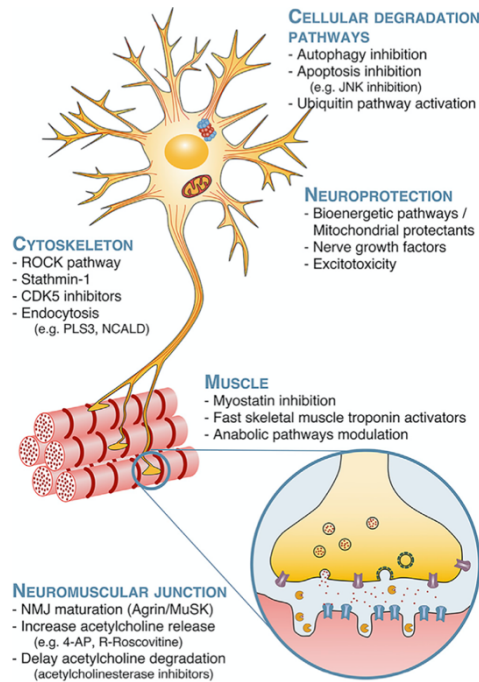
Par conséquent, connaissant l'implication de la protéine SMN dans la survie des motoneurones et dans la fonction motrice, l'élargissement des cibles thérapeutiques pour améliorer la fonction neuromusculaire, par exemple, serait une alternative pour compléter l'efficacité des stratégies actuellement sur le marché.

Treatment	Advantages	Limitation
Nusinersen, Spinraza	<ul style="list-style-type: none"> <li>Highly specific, targets only <i>SMN2</i></li> <li>Can be applied to all patients at any age</li> <li>Very few side effects</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>SMN</i> increase depends on the <i>SMN2</i> copy number</li> <li>CNS only</li> <li>Repetitive invasive intrathecal injection</li> <li>Side effects due to intrathecal injection</li> <li>Additional expense due to inpatient admission</li> <li>Highest cost converted to life expectancy (US\$750 000 first year; US\$350 000/year thereafter)</li> </ul>
Risdiplam, Evrysdi	<ul style="list-style-type: none"> <li>Orally administered</li> <li>Systemic distribution</li> <li>Can be applied to all SMA types, if the patient is older than 2 months</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Daily administration</li> <li>Increase depends on <i>SMN2</i> copies</li> <li>Neonatal administration excluded</li> <li>Also targets other transcripts, potential off-target effects and increased side-effects in the long term</li> <li>Lower costs compared to the other two products, but still high (US\$100 000–340 000 US\$/year weight dependent)</li> </ul>
Onasemnogene abeparvovec, Zolgensma	<ul style="list-style-type: none"> <li>One-time dosing</li> <li>Systemic distribution</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Restricted to individuals with three or fewer <i>SMN2</i> copies in Europe</li> <li>Cannot be applied to patients with antibody titer &gt;50 mg/ml</li> <li>Very limited knowledge of long-term effects of scAAV9</li> <li>Albeit low, potential risk of virus integration into the genome</li> <li>Restricted age limitation due to inability to pass the blood-brain barrier and the maximum viral load that can be administered</li> <li>Insufficient knowledge about potential toxicity of too-high <i>SMN</i> levels with aging</li> <li>Re-injection not possible due to antibody building</li> <li>Amount is diluted with every replication of a dividing cell</li> <li>Side effects (e.g., liver toxicity)</li> <li>Extremely high, but one-time, cost of US\$2.1 million</li> </ul>

**Tableau 7 : Comparaison des trois thérapies SMA actuellement disponibles. Adapté de Wirth et al., 2020.**

## 7.2. Stratégies indépendantes de SMN

En plus des différentes limites présentées ci-dessus, toutes les personnes atteintes de SMA ne sont pas éligibles aux thérapies génétiquement ciblées, comme les nourrissons avec quatre copies ou plus de *SMN2* ainsi que les adultes ayant déjà subi une perte importante de motoneurones (Darras and De Vivo, 2018). Pour ces raisons, un grand nombre de stratégies thérapeutiques indépendantes de SMN ont été et sont encore étudiées (**Figure 18**). Ces stratégies thérapeutiques ont pour but d'être élargies à tout le spectre de la SMA et être utilisable en combinatoire avec des approches dépendantes de SMN.



**Figure 18 : Schéma des principales cibles thérapeutiques potentielles indépendantes du SMN.** En raison des divers rôles cellulaires et de l'expression ubiquitaire de SMN, de nombreux processus et organes cellulaires ont été identifiés comme cibles thérapeutiques potentielles (Chaytow et al., 2021).

### 7.2.1. Les Neuroprotecteurs

L'olesoxime, une thérapie ciblant les mitochondries, a été initialement montré pour favoriser la survie des cellules dans des conditions de stress *in vitro*, probablement via la modulation de la perméabilité de la membrane mitochondriale (Bordet et al., 2010). En tant que tel, l'olesoxime pourrait être largement applicable pour les maladies neurodégénératives et s'est avérée tripler la durée de vie du modèle murin sévère SMA (Bordet et al., 2010). L'olesoxime a montré un bon profil d'innocuité chez les patients de type II/II ainsi qu'une amélioration modérée de la fonction motrice (Bertini et al., 2017). Le laboratoire Roche l'a donc testé en essai clinique de phase II/III, mais l'essai a été annulé en raison de difficulté dans le choix du dosage et la production. Cependant, en raison de la demande actuelle de traitements combinatoires, l'olesoxime pourrait revenir comme sujet de recherches futures (Weber et al., 2019).

### 7.2.2. *Protection musculaire*

Dans le but de limiter les atteintes du muscle squelettique au cours de la maladie, plusieurs stratégies ont été envisagées (**Tableau 6**). Une stratégie est actuellement en étude dans le but d'augmenter la masse musculaire en inhibant une protéine régulant la croissance du muscle, la myostatine. Un inhibiteur sélectif de la myostatine (SRK-015) s'est révélé prometteur chez les souris SMA (Long et al., 2019), et a été testé chez des patients atteints de SMA de type II/III (NCT03921528). Le laboratoire Scholar Rock a annoncé des résultats intermédiaires positifs, avec une augmentation de la fonction motrice chez les patients recevant la dose élevée, sans effets indésirables significatifs.

Les activateurs de troponine prolongent la liaison du calcium au complexe de troponine du muscle squelettique rapide, augmentant ainsi la contractilité musculaire et réduisant le coût énergétique de la contraction (Cheng et al., 2019). Cette cible est à la base de nombreuses petites molécules développées par Cytokinetics. Malheureusement, les résultats d'une étude de phase II chez des patients SMA de type II à IV traités par reldesemtiv (CK-2127107) n'étaient pas prometteurs ; sur les 10 critères de jugement principaux, seule une amélioration de la pression expiratoire maximale a été observée (NCT02644668).

### 7.2.3. *NMJs preservation*

L'augmentation de la fatigabilité est un symptôme majeur chez les patients SMA de type II/III, et des études répétées montrent une diminution de conduction nerveuse, confirmant que le dysfonctionnement de la NMJ pourrait jouer un rôle clé dans la fatigabilité (Wadman et al., 2012). Par conséquent, un essai clinique de phase II évalue actuellement les effets du pyridostigmine, un inhibiteur de l'acétylcholinestérase couramment prescrit pour la myasthénie gravis pour augmenter l'efficacité de la transmission cholinergique pour les patient SMA de type II (NCT02941328) (Stam et al., 2018). Des rapports préliminaires suggèrent que la pyridostigmine réduit la fatigabilité chez les patients et devrait être considérée comme un traitement d'appoint possible.

Enfin, en parallèle des traitements médicamenteux, l'exercice physique a été démontré comme permettant d'améliorer la fonction musculaire. Dans un modèle murin SMA modéré, l'exercice aérobie de forte intensité en piscine ou en course de faible intensité permet de réduire la perte des motoneurons et les défauts des NMJ et d'améliorer la fonction musculaire de manière indépendante au niveau de SMN (Chali et al., 2016). Ces résultats ont permis l'ouverture d'une étude pilote chez des patients SMA type II et III (NCT02061189). Les résultats montrent une augmentation de la fonction oxydative et de la force musculaire chez les patients SMA de type III (Lewelt et al., 2015; Madsen et al., 2015). Enfin, après démonstration d'une bonne tolérance de la thérapie par vibration du corps en entier chez des patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) (Vry et al., 2014) (Vry et al., 2014), un essai clinique a été lancé chez les patients SMA de type III dont on attend les résultats (NCT03056144).

#### 7.2.4. Recherche de pistes thérapeutiques indépendantes de SMN

En raison des nombreux processus cellulaires altérés dans la SMA, les avancées dans la compréhension des mécanismes sous-jacents ont permis d'identifier d'autres cibles, indépendante de SMN, comme pistes thérapeutiques potentielles. Ceux-ci incluent la voie Rho kinase (ROCK) (Bowerman et al., 2012; Hensel et al., 2017; Nölle et al., 2011), la voie JNK (Genabai et al., 2015; Schellino et al., 2018), et la voie p53 (Simon et al., 2017) qui sont toutes retrouvées dérégulées dans la SMA.

- La voie ROCK : Le cytosquelette joue un rôle clé dans le maintien de la compartimentation et de la polarisation des neurones. Dans un modèle de souris SMA, la dérégulation de la voie RhoA/Rho kinase (ROCK) a été identifiée comme associée à une perturbation des voies de l'actine, affectant la croissance, la différenciation et la régénération neuronale (Nölle et al., 2011). L'inhibition pharmacologique de la voie ROCK par le médicament Fasudil a permis d'améliorer la survie, la maturation des NMJ et le développement musculaire dans un modèle murin intermédiaire de SMA (Bowerman et al., 2012).

- La voie JNK : La voie de signalisation JNK joue un rôle central dans l'apoptose neuronale et constitue une cible thérapeutique pour de multiples troubles neurodégénératifs (Musi et al., 2020). Il a été démontré que la voie JNK est activée dans la moelle épinière des souris et des patients SMA (Genabai et al., 2015), bien qu'une étude plus récente ait contesté ces résultats (Pilato et al., 2019). Ces incohérences peuvent être dues aux différents moments pris en compte pour les analyses. En effet, JNK et/ou d'autres voies moléculaires (prp-apoptotiques) peuvent être activées différemment au cours de la vie cellulaire : probablement l'analyse de leur expression dans les MN à des phases ultérieures de la maladie (eg., P16 dans le modèle murin  $\Delta 7$ , comme dans (Pilato et al., 2019) pourrait ne révéler aucune différence dans le tissu SMA, car à ce stade, la dégénérescence des MN est déjà bien installée. Néanmoins, le fait que l'inhibition génétique (Genabai et al., 2015) et pharmacologique (Schellino et al., 2018) de la voie JNK entraîne une amélioration de la durée de vie et de la fonction motrice suggère qu'il pourrait s'agir d'une voie thérapeutique pertinente pour la SMA. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour clarifier ces aspects.

- La voie p53 : La perte de SMN active le suppresseur de tumeur p53 (Simon et al., 2019). La voie p53 présente donc une cible thérapeutique attrayante, car il est rapporté qu'elle entraîne la mort des motoneurones dans un modèle murin sévère de SMA (Simon et al., 2017). La perte de SMN pourrait conduire à une réduction en aval de Stasimon, une protéine transmembranaire localisée dans le réticulum endoplasmique (RE), activant ainsi p53 (Simon et al., 2019). Cette même étude a montré que la surexpression de Stasimon, dans un modèle murin SMA, était suffisante pour bloquer la dégénérescence des motoneurones. Cependant, il n'est pas clairement défini si cet effet est réellement indépendant de SMN. En effet, une analyse plus approfondie a montré une augmentation des transcrits de *SMN2* chez les souris traitées. Cette voie pourrait également être ciblée via l'inhibition de p38 à l'aide de MW150, empêchant ainsi la phosphorylation et l'activation de p53 (Simon et al., 2019). La voie p38 est éga-

lement le mécanisme d'action proposé pour le célécoxib, un anti-inflammatoire non-stéroïdien, qui prolonge la durée de vie dans un modèle de souris intermédiaire (Farooq et al., 2013; Wadman et al., 2020). Ces résultats avaient abouti à un essai clinique de phase II qui a été interrompu prématurément sans que les raisons ne soient encore publiées (NCT02876094).

### 7.3. Challenges et perspectives :

Vingt-cinq ans après la découverte du gène SMN, trois médicaments sont aujourd'hui sur le marché et montrent des résultats considérables pour la SMA. Il est toutefois important de préciser qu'avec l'arrivée de ces nouvelles thérapies, le domaine de la SMA évolue vers une nouvelle ère. En effet, les trajectoires de la maladie diffèrent significativement de ce qui était initialement connu et nous faisons face à l'émergence de nouveaux phénotypes. Des études longitudinales systématiques seront nécessaires pour étudier ces nouveaux phénotypes potentiels afin d'améliorer leur prise en charge. De plus, un ensemble de résultats démontrent la nécessité d'un dépistage néonatal de la SMA afin d'administrer les traitements le plus précocement possible, de manière pré-symptomatique, afin d'optimiser leurs effets. Dans le but de faire face aux différentes limites que représentent les thérapies actuellement disponibles, et optimiser la prise en charge de tous les patients atteints de SMA, différents rapports soulignent le besoin de développer des thérapies combinatoires, indépendantes de SMN (Mercuri, 2021; Schorling et al., 2020).

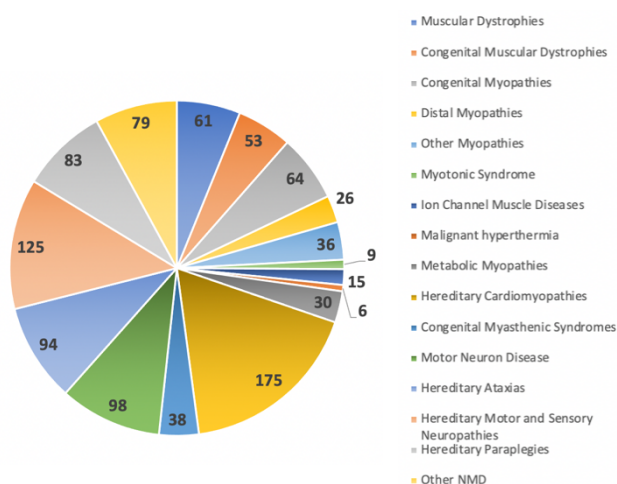
Il reste de nombreuses questions ouvertes, qui nécessitent des études approfondies : quelles fonctions de SMN sont impliquées dans le développement physiopathologique de la SMA et dans quelle mesure la spliceopathie y contribue ? Quelle quantité de SMN est nécessaire, quand et pendant combien de temps pour un fonctionnement cellulaire normal ? Les thérapies futures devront-elles s'employer à restaurer la fonction de SMN de manière systémique et/ou utiliser en combinatoire avec des approches SMN-indépendantes ? De nouveaux modèles d'étude cellulaires humains capables de reproduire la complexité du processus physiopathologique de la SMA devront par conséquent être élaborés pour tenter de répondre à ces questions. Toutefois, la SMA peut être considérée aujourd'hui comme un paradigme dans la manière dont la génétique peut ouvrir la voie au développement de thérapies ciblées.

## Chapitre II : Les atteintes de la jonction neuromusculaire dans la SMA

Sur la base d'examen cliniques et d'analyses d'échantillons pathologiques au stade terminal, la SMA a pendant longtemps été caractérisée comme une maladie du motoneurone. Les études de compréhension des mécanismes impliqués dans la SMA, et donc les stratégies thérapeutiques, se sont donc pendant longtemps focalisées sur les atteintes motoneuronales. Or, depuis la dernière décennie, des analyses basées sur différents modèles animaux et *in vitro* SMA ont mis en évidence des atteintes de la jonction neuromusculaire (NMJ). Ces anomalies de maturation et de fonction de la NMJ sont détectables à des temps précoces et avant même la mort des motoneurones, chez les souris SMA pré-symptomatiques. Il est donc admis aujourd'hui que la SMA n'est plus exclusivement une maladie du motoneurone mais bien une maladie neuromusculaire.

### 1. La jonction neuromusculaire

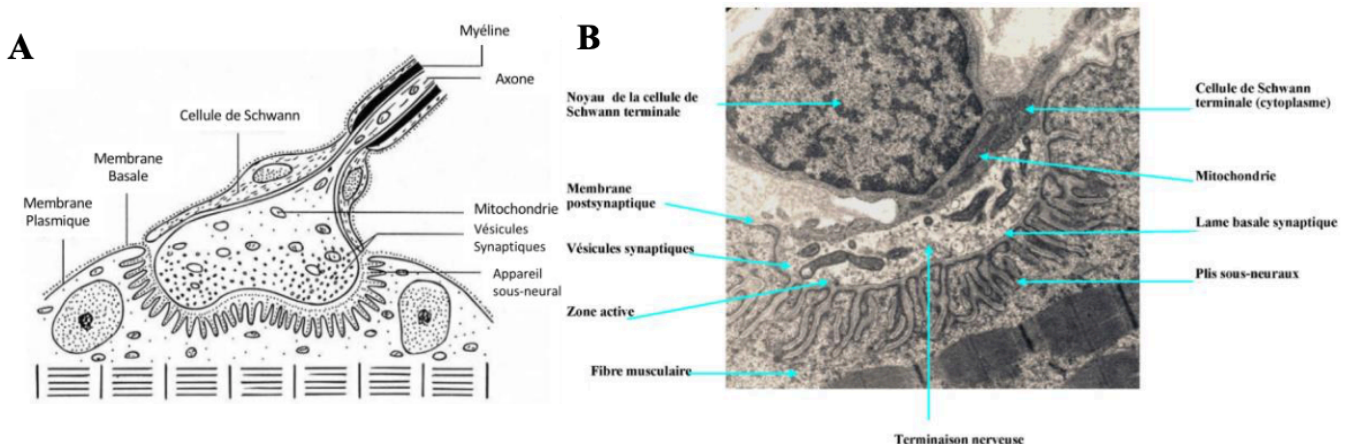
Les maladies neuromusculaire (NMD) regroupent environ 600 pathologies dont l'origine des défauts peut être pré- ou post-synaptique mais qui se caractérisent toutes par des perturbations au niveau de la jonction neuromusculaire (NMJ). La NMJ est constituée de trois compartiments : pré-synaptique, synaptique, et post-synaptique pouvant être différemment affectés (**Figure 19**). A titre d'exemple, l'Amyotrophie Spinale Infantile (SMA) et la Sclérose Latérale Amyotrophie (ALS) se caractérisent par des atteintes préférentiellement pré-synaptiques. Les dystrophies myotoniques (DM1 et DM2) et la myopathie de Duchenne (DMD) sont quant à elle considérées comme des pathologies affectant le compartiment post-synaptique. D'autres pathologies, telles que les Syndromes Myasthéniques Congénitaux (CMS) peuvent atteindre les trois compartiments du système neuromusculaire suivant la mutation.



**Figure 19 : Les maladies neuromusculaires, un très large groupe avec des troubles différents.**  
Adapté de (Benarroch et al., 2019).

Historiquement, la NMJ a été l'une des synapses les plus étudiées, de par son accessibilité et sa grosseur dans les modèles animaux tels que la grenouille. Les premières études de la NMJ sont d'ailleurs à l'origine de la découverte du principe de synapse chimique. La première démonstration de la transmission chimique, au sein d'une NMJ, fut réalisée par Dale et ses collègues en 1936 (Dale et al., 1936). Au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle, la première description de la NMJ des vertébrés est fournie grâce à des techniques alliant histologie et microscopie électronique (Couteaux, 1947; 1963). Ces études pionnières ont ainsi fortement participé aux connaissances actuelles de la NMJ, qui sont indispensables pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques des maladies neuromusculaires.

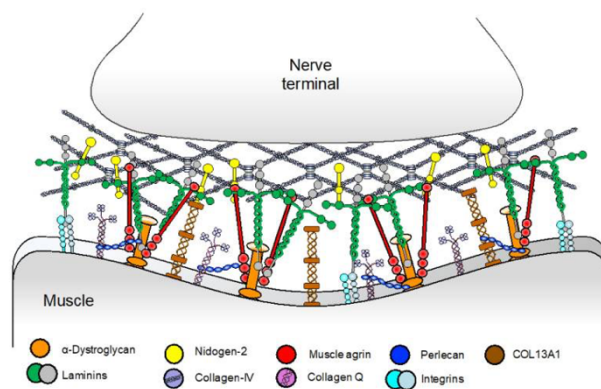
La NMJ est communément divisée en trois parties : le compartiment pré-synaptique avec le motoneurone (MN)  $\alpha$ , le compartiment synaptique où se trouve la lame basale et le compartiment post-synaptique avec la fibre musculaire. La cellule de Schwann terminale (tSC), se trouve apposer au niveau pré-synaptique et enveloppe la NMJ (**Figure 20**). La terminaison axonale du MN, appelé bouton synaptique/terminal, est spécialisée dans la libération du neurotransmetteur : l'acétylcholine (ACh). Les vésicules synaptiques sont concentrées au niveau de « zones actives », correspondant à des épaissements de la membrane nerveuse (ou membrane pré-synaptique) où se produisent les phénomènes de fusion-exocytose des vésicules synaptique permettant la libération de leur contenu dans la fente synaptique (Couteaux and Pécot-Dechavassine, 1970; Lai et al., 2017). Un MN n'innervé qu'un seul muscle mais plusieurs fibres musculaires. La zone de communication entre MN et la fibre musculaire innervée correspondante est appelée « unité motrice ». Au niveau de la NMJ, la membrane de la fibre musculaire (ou membrane post-synaptique) présente une dépression : la gouttière synaptique. Cette gouttière synaptique permet de répondre rapidement à la libération du neurotransmetteur dans la fente synaptique par la dépolarisation de la plaque motrice et la génération d'un potentiel d'action musculaire. La membrane post-synaptique présente une concentration très élevée de récepteurs à l'ACh (AChR) (Salpeter and Loring, 1985). Ces récepteurs sont des canaux transmembranaires perméables aux cations lors de la liaison du ligand (Slater, 2017, 2015).



**Figure 20 : Structure de la jonction neuromusculaire humaine.** (A) Représentation schématique de la NMJ, (B) Photographie de microscopie électronique d'une NMJ humaine. *Adapté de (Rigoard et al., 2009).*



La fente synaptique, qui sépare la terminaison nerveuse de la membrane post-synaptique, contient un réseau dense aux électrons constitué de glycoprotéines et de protéoglycanes : la lame basale synaptique (**Figure 21**). Cette lame basale synaptique s'insinue jusque dans les plis sous-neuraux. La lame basale synaptique diffère partiellement de la lame basale extra-synaptique, recouvrant l'ensemble de la fibre musculaire squelettique en dehors de la zone jonctionnelle, par sa composition. En plus des molécules communes à toutes les lames basales (collagène de type IV, entactine, fibronectine, perlecan, laminines  $\alpha 2$  et  $\gamma 1$ ), elle contient en particulier les formes asymétriques des enzymes de dégradation de l'ACh : acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase (BChE) (Blotnick-Rubin and Anglister, 2018; Petrov et al., 2018, 2014). Elle renferme également des isoformes spécifiques de la laminine contenant la sous-unité  $\beta 2$  et des facteurs sécrétés par le MN comme l'agrine et la neuréguline (Lee et al., 2016; Massoulié and Millard, 2009).



**Figure 21 : Représentation schématique de la lame basale synaptique et de ses principaux composants (Rodríguez Cruz et al., 2018).**

Enfin, la cellule de Schwann terminale (tSC) coiffe la terminaison nerveuse et semble jouer un rôle important dans la formation, le maintien et la régénération des NMJ (Barik et al., 2016; Feng and Ko, 2008). Entre 3 et 5 tSC sont présentes au niveau d'une NMJ (Jordan and Williams, 2001). Elles libèrent ainsi de nombreux facteurs trophiques comme le NGF (facteur de croissance du nerf) ou le CNTF (facteur neurotrophique ciliaire) (Singh et al., 2020; Terenghi, 1999). La tSC joue aussi vraisemblablement un rôle de modulation de l'efficacité de la transmission synaptique par le biais de variations de calcium intra-cytoplasmique (Castonguay et al., 2001; Castonguay and Robitaille, 2001; Heredia et al., 2018). Récemment un 4<sup>ème</sup> partenaire, le kranocyte, a été décrit comme étant impliqué dans la NMJ. Tout comme les tSC, ces cellules couronneraient la NMJ et pourraient jouer un rôle dans sa régénération (Court et al., 2008). Cependant, ce type cellulaire reste encore très peu caractérisé.

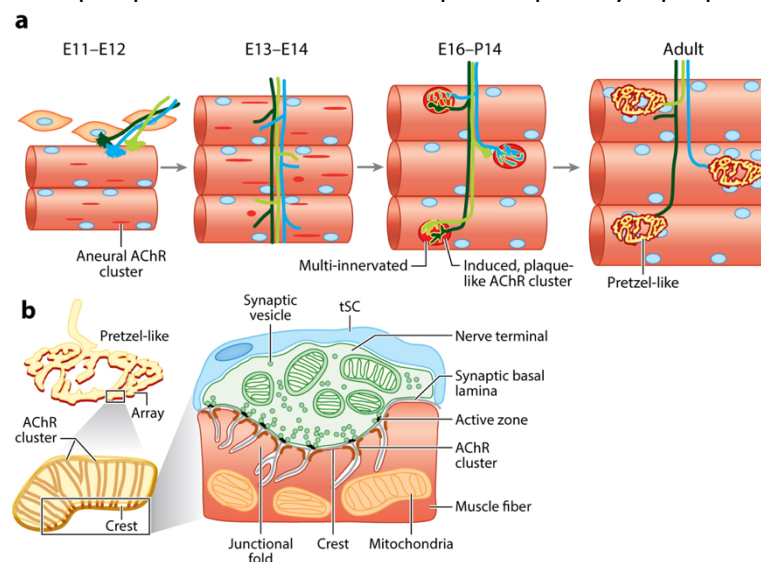
## 2. Développement et maturation de la jonction neuromusculaire

### 2.1. Étapes de la formation de la jonction neuromusculaire

La formation de la NMJ implique la différenciation des terminaisons nerveuses

présynaptiques, des membranes musculaires postsynaptiques et des tSC. Son développement est étroitement lié à la myogenèse. En effet, à partir du stade E11-E12, avant l'arrivée des terminaisons nerveuses motrices, des petits agrégats de récepteurs à l'acétylcholine (AChR) se forment au niveau de la région centrale de la fibre musculaire. Ce phénomène, appelé « pré-patterning », est une étape importante pour la préparation de la fibre musculaire à l'arrivée du motoneurone (**Figure 22a**) (Kummer et al., 2006; Zhang et al., 2009). Lors des premiers contacts entre les terminaisons nerveuses et les fibres musculaires, de nouveaux clusters se forment et dispersent les précédents dans les zones non synaptiques. Initialement, les clusters AChR apparaissent comme des plaques ovales qui sont souvent innervées par plus d'un axone (entre 1 et 10) (E16-P14) (Tintignac et al., 2015).

Les étapes finales de la formation de la NMJ ont lieu dans les 3 semaines suivant la naissance de la souris. Durant cette période, l'innervation multiple se réduit à une innervation simple lors du processus d'élimination des synapses (Lin et al., 2008). La composition des AChR change à ce même moment. En effet, l'AChR est un hétéro-pentamères composés 2 sous-unités  $\alpha$ , 1 sous-unité  $\beta$ , 1 sous-unité  $\delta$  et 1 sous-unité  $\gamma$  dans l'embryon. Lors de la maturation de la NMJ, la période post-natale est caractérisée par le remplacement de la sous-unité  $\gamma$  en sous-unité  $\epsilon$ . Au fur et à mesure de la maturation de la NMJ, les plaques se perforent et finissent par apparaître sous la forme de bretzel (**Figure 22**), tout du moins chez la souris car cette forme ne semble pas être retrouvée chez l'homme (Barbeau et al., 2020; Boehm et al., 2020). La maturation de la NMJ entraîne une augmentation du nombre, de la stabilité et du regroupement des AChR dans le compartiment post-synaptique, ainsi que la différenciation de la membrane présynaptique en zones actives avec des protéines synaptiques appropriées et des vésicules synaptiques associées (Burden et al., 2018). Cette spécialisation reflète une forte signalisation réciproque entre les structures pré- et post-synaptiques.



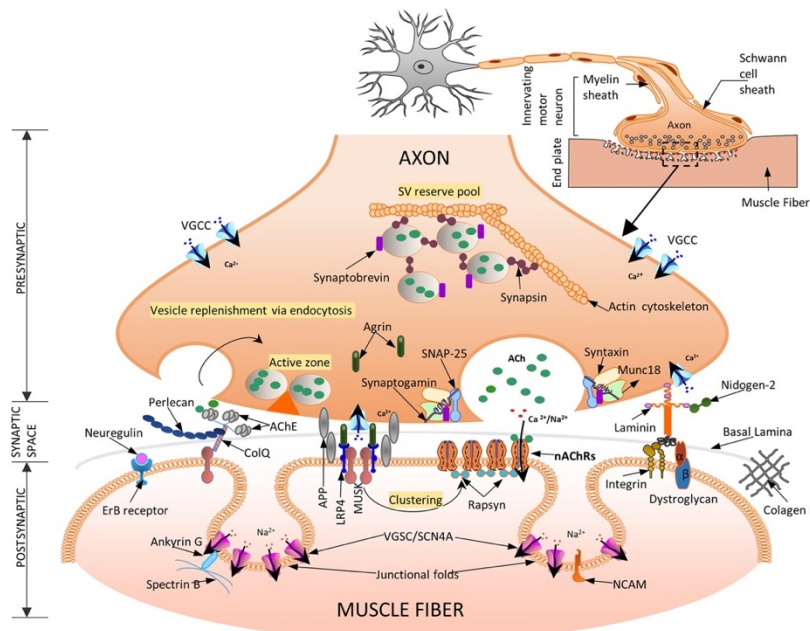
**Figure 22 : Les différentes étapes du développement de la jonction neuromusculaire chez la souris (Li et al., 2018).**

L'autre autre élément crucial impliqué dans la formation de la NMJ est la cellule de

Schwann terminale (tSC). En effet, bien que les toutes premières étapes de la formation des synapses ne nécessitent pas la présence de tSC, ces cellules sont nécessaires au maintien et à la maturation des NMJ (Ko and Robitaille, 2015). L'ablation des tSC après maturation du NMJ à P30 chez la souris conduit à une fragmentation de la NMJ et à des défauts de transmission neuromusculaire (Barik et al., 2016).

## 2.2. Composants moléculaires du développement et de la maturation de la NMJ

Des progrès considérables ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la formation, la maintenance et la maturation de la NMJ. L'ensemble de ces étapes est assuré par plusieurs molécules clés intervenant soit dans la transduction du signal vers le compartiment post-synaptique ou la rétro-transduction du signal vers le compartiment pré-synaptique (**Figure 23**).



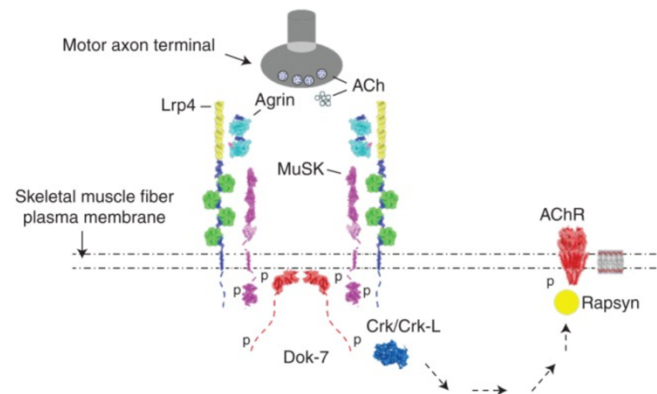
**Figure 23 : Caractéristiques musculaires, neuronales et synaptiques de la jonction neuromusculaire mature (Mukund and Subramaniam, 2020).**

- **Voie de signalisation MuSK-Lrp4-agrine**

Les premières molécules déterminantes pour la mise en place des NMJ sont MuSK (muscle-specific kinase), un récepteur transmembranaire de la tyrosine kinase, et son corécepteur LRP4 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 4). Ces deux molécules sont en effet essentielles pour la formation des clusters de AChR (**Figure 24**). Avec l'innervation, LRP4 se lie à une isoforme neuronale de l'agrine (AGRN), un protéoglycane sulfate d'héparane sécrété par l'axone terminal (Ferns et al., 1993; Kim and Burden, 2008; Zhang et al., 2008). L'interaction de AGRN avec LRP4 entraîne la formation de complexes AGRN-LRP4 qui favorisent l'activation et la transphosphorylation de MuSK, conduisant au regroupement d'AChR et à la formation de la NMJ (Li et al., 2018; Zhang et al., 2011; Zong et al., 2012). Les clusters de AChR qui sont apposés aux terminaisons nerveuses persistent et se

développement, tandis que ceux non innervés se désassemblent (Wallace, 1989).

Plus récemment, deux études ont révélé de manière indépendante que LRP4 agit également comme un signal rétrograde pour la différenciation pré-synaptique (Jing et al., 2021; Wu et al., 2012; Yumoto et al., 2012). Dok7 (docking protein 7) est une protéine adaptatrice exprimée par le muscle et indispensable à l'activité de MuSK et donc au clustering AChR. La liaison de Dok7 à la région cytoplasmique juxta-membranaire de MuSK augmente fortement l'activité tyrosine kinase de MuSK, conduisant à son activation (Hamuro et al., 2008; Inoue et al., 2009). Les souris déficientes en MuSK ne présentent ni pré-structuration musculaire des AChR ni formation de NMJ, et meurent au stade périnatal d'insuffisance respiratoire (Okada et al., 2006). Plus récemment, il a été montré que la perte d'expression du gène Dok7 chez la souris en post-natal provoque des défauts structurels dans les NMJ et un dysfonctionnement moteur, soutenant un rôle de Dok7 dans le maintien de la NMJ (Eguchi et al., 2020, 2016; Ueta et al., 2020).



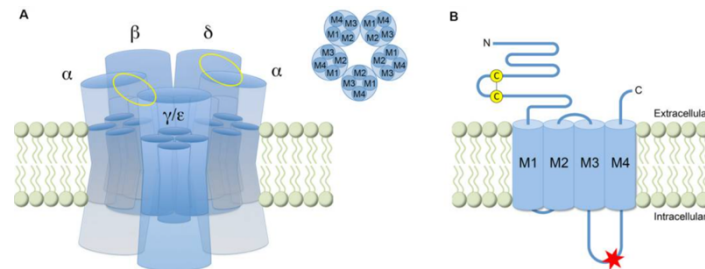
**Figure 24 : Activation du complexe Musk-Lrp4-Agrin.** Les axones des MN libèrent de l'Aggrin et de l'ACh. L'aggrine se lie à Lrp4, ce qui stimule l'association entre Lrp4 et MuSK et la phosphorylation de MuSK. Une fois phosphorylé, MuSK recrute Dok7, qui forme un dimère et stabilise un dimère de MuSK. La phosphorylation de la tyrosine de Dok7 stimule le recrutement de Crk/Crk-L, ce qui conduit à l'ancrage de Rapsyn et d'AChR sur des sites où MuSK est activé (Burden et al., 2013).

- **Voie de signalisation AChR-rapsyne**

Au moment de la naissance, les AChR fœtaux ( $\alpha 2\beta\gamma\delta$ ) sont progressivement remplacés par le sous-type adulte d'AChR ( $\alpha 2\beta\epsilon\delta$ ) (Figure 25). Bien que la signification physiologique de ce changement au cours du développement reste encore mal comprise, différentes études ont suggéré un rôle de la sous-unité  $\gamma$  au cours de la formation de la NMJ (Koenen et al., 2005; Tintignac et al., 2015). Par exemple, la délétion de la sous-unité  $\gamma$  de l'AChR entraîne une létalité périnatale chez la souris. Celle-ci serait associée à une absence de clusters d'AChR pré-configurés au cours des étapes initiales de la synaptogenèse neuromusculaire (Koenen et al., 2005; Takahashi et al., 2002).

Rapsyne, une protéine d'échafaudage cytoplasmique exprimée dans le muscle, qui se lie directement à l'AChR et ancre l'AChR dans la membrane post-synaptique a été identifiée comme étant un effecteur clé dans le regroupement des AChR (Lee et al., 2009; Sobel et al., 1978). En effet, il a été montré que les souris déficientes en rapsyne ne parviennent pas à développer de spécialisation post-synaptique (Gautam et al., 1995), indiquant que la rapsyne

est essentielle pour l'attache des AChR au compartiment post-synaptique. Bien que la rapsyne s'assemble avec les AChR dans la voie sécrétoire, les mécanismes exacts en aval de la voie MuSK/Dok7 qui stimulent le regroupement d'AChR induit par rapsyne restent à déterminer (Marchand et al., 2002; Moransard et al., 2003; Oury et al., 2019).



**Figure 25 : Représentation schématique du récepteur à l'acétylcholine (AChR).** (A) L'AChR est composé de 5 sous-unités dont  $\gamma$  est spécifique de la forme embryo-fœtale et  $\epsilon$  exprimée à l'âge adulte. Chaque sous-unité possède 4 domaines de M1 à M4. (B) 4 domaines transmembranaires sont présents et les extrémités N- et C-terminales sont situées du côté extracellulaire (Cetin et al., 2020).

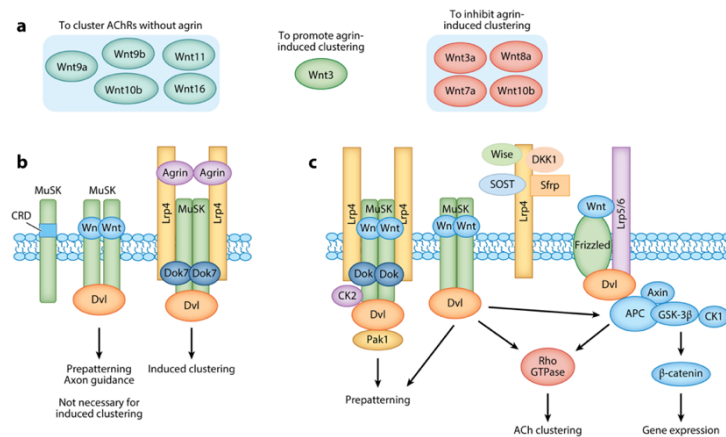
- **Composants extracellulaires**

En plus de ces molécules clés essentielles à la formation de la NMJ, un certain nombre d'autres régulateurs participent aussi à ce processus, comme les protéines Wnt. Les Wnt sont un groupe de glycoprotéines sécrétées au niveau de la NMJ par la fibre musculaire, les motoneurones et les tSC. Les protéines Wnt peuvent se lier à leur complexe récepteur Frizzled/Lrp ou directement à MuSK (Jing et al., 2009; Messéant et al., 2017, 2015; Valenzuela et al., 1995) et jouent un rôle dans l'extension et la ramification des axones, ainsi que dans la préparation des AChR (**Figure 26**) (Li et al., 2018). A ce jour il a été identifié que parmi la famille des Wnt, certaines régulent positivement ou négativement les clusters de AChR. Les Wnt 4, 9a, 11 et 16 auraient un effet positif sur le pré-patterning ou la formation des clusters de AChR via MuSK (Barik et al., 2014; Strohlic et al., 2012; Zhang et al., 2012). Les Wnt 7a, 8a et 3a réguleraient quant à eux négativement et indépendamment de MuSK (Barik et al., 2014; Henriquez et al., 2008; Shen et al., 2018).

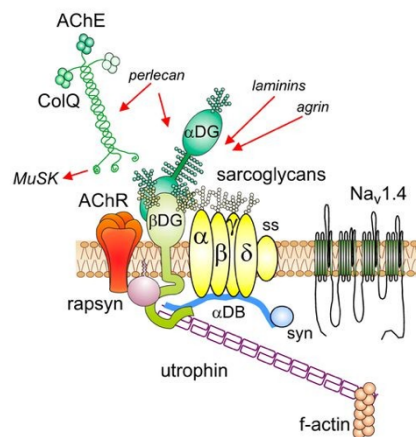
- **Complexe protéique de la lame basale synaptique**

La lame basale synaptique contient de nombreux composants qui jouent le rôle de régulateurs importants dans la myogenèse et la synaptogenèse (**Figure 27**). Les molécules d'ECM aident à guider le processus d'innervation par les motoneurones et sont essentielles à l'organisation et au maintien de l'apposition fonctionnelle des éléments pré- et post-synaptiques (Maselli et al., 2012; Rogers and Nishimune, 2017). Les composants clés de la lame basale synaptique comprennent : i) les collagènes (collagène IV  $(\alpha3)(\alpha4)(\alpha5)$  et  $(\alpha5)2(\alpha6)$ , le collagène XIII et le ColQ) ; ii) les glycoprotéines, telles que les isoformes de laminine  $\alpha4\beta2\gamma1$ ,  $\alpha5\beta2\gamma1$  et  $\alpha2\beta2\gamma1$ , et nidogen 2 ; iii) les protéoglycanes d'héparane sulfate (HSPG), tels que le perlecan et l'agrine (Cescon et al., 2018; Fox et al., 2007; Sigoillot et al., 2016; Zainul et al., 2018). La chaîne  $\beta2$  de la laminine est considérée comme un organisateur de zones actives et se lie aux canaux calciques voltage-dépendants (VDCC) situés dans ces

zones actives (Nishimune et al., 2004; Rogers and Nishimune, 2017). L'interaction entre la laminine  $\beta 2$  et les VDCC conduit au clustering de VDCC, qui est la première étape vers une zone active mature. Chez les souris *knock-out* pour la laminine  $\beta 2$ , le nombre de zones actives, de vésicules synaptiques et de libération de neurotransmetteurs est réduit. Les souris dépourvues de ColQ, de collagène XIII, de collagène IV ( $\alpha 3$ )( $\alpha 4$ )( $\alpha 5$ ), de trimères ( $\alpha 5$ ) $_2$ ( $\alpha 6$ ) ou de collagène VI présentent également des terminaisons nerveuses et/ou des NMJ immatures (Cescon et al., 2018; Sigoillot et al., 2016; Zainul et al., 2018). De plus, des mutations dans ces gènes, codant des éléments essentiels au développement et au maintien de la NMJ, ont été identifiés et associés à différentes maladies neuromusculaires. Comme par exemple, des mutations dans le gène *ColQ* sont retrouvées chez des patients CMS présentant un déficit en AChE (Barbeau et al., 2020).



**Figure 26 : Voie de signalisation Wnt dans la formation de la NMJ (Li et al., 2018).**



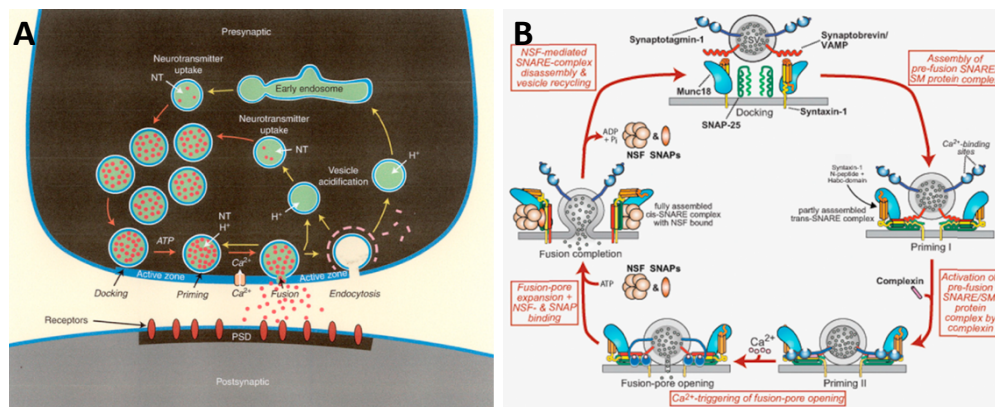
**Figure 27 : Schéma des composants structurels impliqués dans le fonctionnement de la NMJ (Tintignac et al., 2015).**

### 3. Transmission synaptique au niveau de la jonction neuromusculaire

La première démonstration d'une transmission synaptique chimique, et plus précisément cholinergique, a été faite par Dale en 1936 (Dale et al., 1936). Dans les années 50, Del Castillo et Katz mettront ensuite en évidence le caractère quantique et vésiculaire de la libération du neurotransmetteur (Del Castillo and Katz, 1954). Katz et Miledi montreront

par la suite que le potentiel d'action pré-synaptique augmente la libération du neurotransmetteur par une augmentation transitoire de la perméabilité de la membrane présynaptique aux ions calcium (Katz and Miledi, 1965).

La NMJ est une structure hautement spécialisée qui permet le relai de l'information nerveuse vers l'élément musculaire. Notamment, l'axone du motoneurone se modifie structurellement pour contacter la fibre musculaire, en perdant sa couverture myélinisante et en formant plusieurs ramifications qui vont se juxtaposer à la plaque motrice. Ces régions permettent la libération des neurotransmetteurs, vers des récepteurs post-synaptiques présents sur le muscle, et ce, suite à l'arrivée du potentiel d'action provenant du motoneurone. Une machinerie complexe de protéines retrouvées dans la région dense en vésicules synaptiques va permettre de réguler les mécanismes de fusion-exocytose, et de recyclage des vésicules synaptiques contenant les neurotransmetteurs, afin de permettre une communication efficace entre le motoneurone et sa cible musculaire (**Figure 28**) (Slater, 2015).

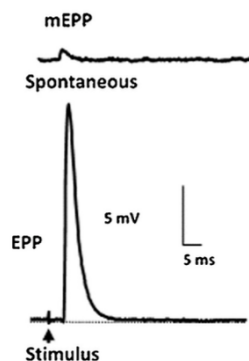


**Figure 28 : Processus d'exocytose et cycle des vésicules synaptiques.** (A) Cycle d'événements par lesquels les vésicules synaptiques emmagasinent puis libèrent les NT pour être ensuite ramenés dans la terminaison nerveuse et être à nouveau remplis (NT, neurotransmetteur ; PSD, densité postsynaptique). (B) Événements moléculaires impliqués dans l'exocytose des vésicules synaptiques, et en particulier la formation d'un complexe de protéines SNARE (Slater, 2015).

L'acétylcholine (ACh), synthétisé grâce à l'enzyme choline acétyltransférase (ChAT) à partir de l'acétyl coenzyme A (AcCoA) et de la choline, est concentrée dans les vésicules synaptiques grâce au transporteur vésiculaire de l'acétylcholine (VACHT) (Nachmansohn and Machado, 1943; Roghani et al., 1994). Des pools de vésicules synaptiques s'accumulent dans le bouton terminal pré-synaptique, près des sites de relâchement appelés zones actives (Südhof, 2012). L'arrivée du potentiel d'action au niveau de la terminaison axonale du motoneurone entraîne l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants et l'afflux d'ions  $Ca^{2+}$  déclenche l'exocytose des vésicules synaptiques. La préparation des vésicules synaptiques à l'exocytose implique plusieurs étapes de changement conformationnel des protéines vésiculaires et de la membrane plasmique par le biais du complexe SNARE (pour Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor) (Baker and Hughson, 2016). Le « docking » va ainsi permettre de concentrer les vésicules près de la membrane et

le « priming » va quant à lui permettre de répondre au signal calcique et entraîner l'exocytose des vésicules dans la fente synaptique (Neher and Brose, 2018).

L'ACh libérée par le bouton terminal pré-synaptique se lie au site de liaison de l'ACh situé aux interfaces des sous-unités  $\alpha$  et  $\delta$  ou  $\epsilon$  de l'AChR. Lors de la liaison à l'ACh, les sous-unités de l'AChR subissent un changement de conformation provoquant l'ouverture du canal cationique (Miyazawa et al., 2003). Cet événement permet à l'afflux d'ions chargés positivement de se déplacer à travers le canal, générant une modification du potentiel membranaire et conduisant à un potentiel de plaque motrice (EPP or end-plate potential) (**Figure 29**). La dépolarisation de la membrane postsynaptique générée par l'EPP est à l'origine d'un potentiel d'action qui va se propager de la plaque motrice au reste du sarcolemme, et déclencher la contraction du muscle (Engel et al., 2015; Slater, 2015). L'amplitude de l'EPP est conditionnée par la quantité d'ACh libérée. En effet, le motoneurone peut libérer spontanément de petites quantités d'ACh et déclencher un potentiel d'action musculaire miniature (mEPP). Il est important de noter que la NMJ est une synapse tout ou rien. Si le potentiel de la plaque terminale n'atteint pas le seuil d'ouverture des canaux sodiques, ou s'il n'y a pas suffisamment de canaux sodiques dans les plis postsynaptiques pour générer un potentiel d'action, la contraction musculaire ne se produit pas. La différence entre l'amplitude de l'EPP et l'amplitude nécessaire à l'apparition d'un potentiel d'action musculaire constitue la marge de sécurité de la transmission synaptique.



**Figure 29 : Bases de la transmission neuromusculaire :** enregistrements intracellulaires d'événements synaptiques dans une NMJ de souris. Potentiel de plaque motrice miniature (mEPP) en réponse à un seul quantum d'ACh (en haut) ; Potentiel de plaque motrice (EPP) suite à la réponse évoquée par les nerfs pour environ 50 quanta d'ACh (en bas) (Slater, 2015).

#### 4. Altérations de la jonction neuromusculaire dans la SMA

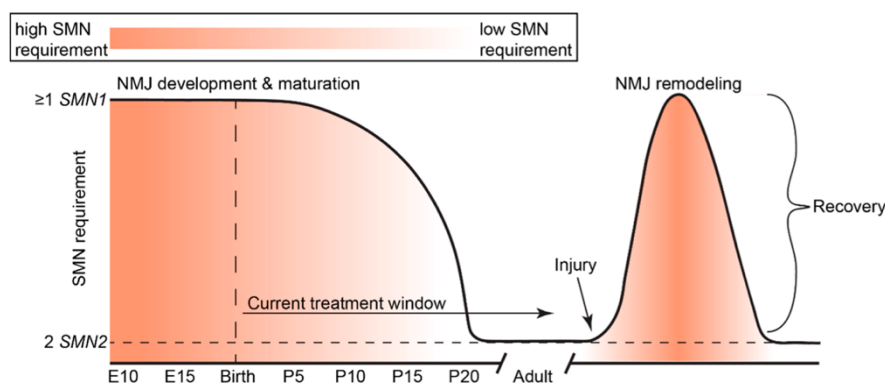
##### 4.1. Implication de SMN dans le développement de la jonction neuromusculaire

Chez l'homme et les mammifères, la protéine SMN est fortement exprimée au cours du développement embryonnaire et postnatal précoce, puis son expression diminue pour atteindre un niveau basal qui se maintient tout au long de la vie (**Figure 30**) (Gabanella et al., 2005; Groen et al., 2018; Lutz et al., 2011). Les niveaux maximaux de protéine SMN dans la moelle épinière sont les plus élevés pendant la fenêtre de développement de la germination des axones de la moelle épinière au début de l'embryogenèse et coïncident avec le début de



la myélinisation (Gabanella et al., 2005; Jablonka et al., 2001). Chez la souris, il a été montré que les niveaux d'expression de *Smn* corrélaient avec des étapes importantes du développement. Ainsi l'expression maximale de *Smn* est observée pendant les jours embryonnaires E10-13 ce qui, de façon intéressante, correspond à la période au cours de laquelle les motoneurones rentrent en contact avec leur cible musculaire. Entre E14 et E19, alors que l'innervation des plaques motrices est finalisée, une diminution de l'expression de la protéine *Smn* est observée (Ling et al., 2012). Une baisse secondaire de l'expression de *Smn* se produit entre les jours postnatals P5 et P15, coïncidant avec le début de la myélinisation (Gabanella et al., 2005; Groen et al., 2018). Il a également été montré dans un modèle de souris que les conséquences de la déplétion de *Smn* à l'âge adulte sont minimales, à l'exception d'une capacité de régénération réduite en réponse à des lésions musculaires (Kariya et al., 2014).

Dans l'ensemble, ces études mettent en lumière l'importance de la temporalité de SMN au cours du développement et ont permis de révéler les périodes critiques au cours desquelles l'expression de SMN doit être restaurée afin d'empêcher l'établissement de défauts irréversibles.



**Figure 30 : Développement de la NMJ et corrélation avec l'expression de SMN chez la souris (Ojala et al., 2021).**

Différentes études, basées majoritairement sur les modèles murins SMA, ont montré que les premiers défauts structurels de la NMJ apparaissent pendant la maturation postnatale, et ce avant la perte de motoneurones (Fletcher et al., 2017; Kariya et al., 2008; Lee et al., 2011; Lefebvre and Sarret, 2020; Vukojicic et al., 2019). Néanmoins, les mécanismes physiopathologiques impliqués dans ces défauts ne sont pas connus.

#### 4.2. Le paradigme des motoneurones comme cible primaire de la SMA

Dans l'étude de la SMA, les premières analyses anatomopathologiques post-mortem, ont été réalisées sur des biopsies de moelles épinières de patients SMA de type I. Ces observations, à des stades tardifs de la maladie, ont permis de mettre en évidence la perte des motoneurones dans la corne ventrale de la moelle épinière (Crawford and Pardo, 1996; Robertson et al., 1978). En accord avec ces premières observations, des analyses de microscopie électronique ont montré que le phénomène de mort des motoneurones, survenant au cours

du développement embryonnaire humain, était prolongé chez les fœtus SMA de type I par rapport aux contrôles (Fidziańska and Rafalowska, 2002; Soler-Botija et al., 2002). De ces observations, est apparue l'hypothèse selon laquelle la mort des motoneurons serait le premier signe clinique de la pathologie.

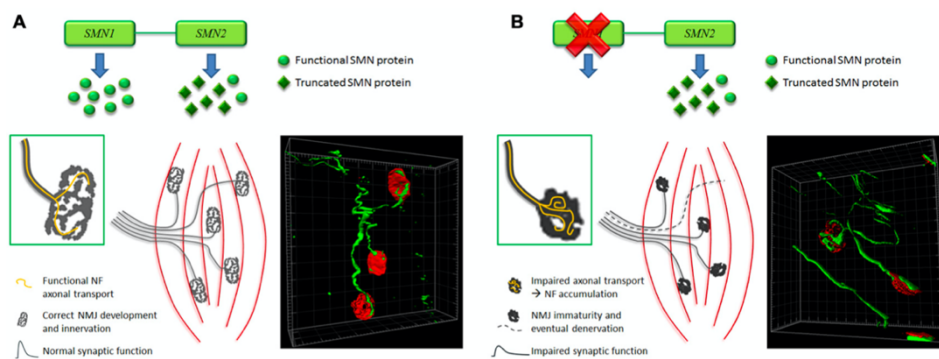
Le développement des différents modèles murins, dans le but de récapituler la SMA humaine, ont d'abord permis de confirmer que les motoneurons sont particulièrement vulnérables aux faibles niveaux de Smn (Frugier et al., 2000; Hsieh-Li et al., 2000; Monani et al., 2000). Cependant, des analyses plus poussées ont mis en évidence que la diminution du nombre de motoneurons ne devenait significative, chez la souris SMA, qu'une fois entrée en phase symptomatique (Bäumer et al., 2009; d'Errico et al., 2013; Le et al., 2005). En effet, les souris hSMN2 et  $\Delta 7$ , modèles de souris SMA sévères, présentent des défauts moteurs dès les premiers jours après la naissance, alors que la diminution du nombre de motoneurons ne devient significative qu'au 5ème et 9ème jours après la naissance (Bäumer et al., 2009; d'Errico et al., 2013; Hua et al., 2015; Le et al., 2005; Monani et al., 2000). Ainsi, ces observations remettent en cause le rôle primaire de la mort des motoneurons dans la progression de la pathologie. Dans le but d'éclaircir cette question, des modèles murins mutants conditionnels ont été développés. Deux stratégies différentes ont été décrites : la déplétion ciblée de Smn dans les MNs et la restauration ciblée de l'expression de SMN dans les MNs (**Tableau 8**).

Ces différentes études démontrent que la restauration ciblée de Smn dans les MN ne permet qu'une amélioration partielle du phénotype des souris SMA. De plus, d'autres analyses, sur différents modèles SMA, ont démontré l'apparition d'altérations neuromusculaires, et plus particulièrement la présence de défauts de la jonction neuromusculaire (NMJ), en phase pré-symptomatique, avant la perte des motoneurons (Boon et al., 2009; Chan et al., 2003; McWhorter et al., 2003; Murray et al., 2010, 2008; Yeo and Darras, 2020).

Modèle	Phénotype	Référence
Souris hSMN2 Souris $\Delta 7$ (SMA-I)	Défauts moteurs dès les premiers jours après la naissance ; la diminution du nombre de MN devient significative qu'à P5-P9	(Bäumer et al., 2009; d'Errico et al., 2013; Monani et al., 2000)
Souris A2G Souris Smn <sup>+/-</sup> (SMA-III)	La réduction du nombre de MN devient significative à 3,5 mois (souris A2G) et à 6 mois (souris Smn <sup>+/-</sup> )	(Jablonka et al., 2000; Monani et al., 2003)
NSE-Cre;SMN <sup>F7</sup> /Smn <sup><math>\Delta 7</math></sup> (neurone-spécifique)	Signes précoces de déficits moteurs (2 semaines post-natales), défauts NMJ : accumulation neurofilaments ; atrophie musculaire caractéristique d'une dénervation ; viabilité réduite de 25 jours en moyenne	(Cifuentes-Diaz et al., 2002; Frugier et al., 2000)
Olig2-Cre;SMN2 <sup>+/+</sup> ;Smn <sup>F7/-</sup> (MN-spécifique)	Signes de défauts moteurs (réflexe de retournement) distinguables entre P2 et P14 ; atrophie musculaire ; diminution du nombre de fibres ; réduction des MN à P40 ; durée de vie supérieure à 12 mois (70%)	(Park et al., 2010)
SMN2 <sup>tg/tg</sup> ;Smn <sup>-/-</sup> ;PrPSmn (moelle épinière et muscle)	Restauration de SMN dans les motoneurons : survie 150 jours – Maintient du nombre de motoneurone	(Gavrilina et al., 2008)
SMN2 <sup>tg/tg</sup> ;SMN $\Delta 7$ <sup>tg/tg</sup> ;Smn <sup>Res/Res</sup> ;ChAT <sup>Cre</sup> (MN et tronc cérébral spécifique)	Restauration de SMN dans les motoneurons et le tronc cérébral : survie 23 jours et légère amélioration du phénotype	(Martinez et al., 2012)
SMN2 <sup>tg/tg</sup> ;SMN $\Delta 7$ <sup>tg/tg</sup> ;Smn <sup>Res/Res</sup> ;HB9 <sup>Cre</sup> (MN spécifique)	Restauration de SMN dans les motoneurons : pas d'amélioration du phénotype	(Paez-Colasante et al., 2013)

**Tableau 8 : Modèle murins développés pour étudier la perte des motoneurons dans la SMA** : modèles de déplétion/restauration ciblée de SMN dans les MN. *Adapté de (Yeo and Darras, 2020).*

Depuis ces dix dernières années, les observations de défauts de NMJ ont été rapportées chez des patients SMA (Martínez-Hernández et al., 2014; Querin et al., 2018; Swoboda et al., 2005) et dans une variété de modèles animaux SMA, y compris les souris (Courtney et al., 2019; Murray et al., 2010), la drosophile (Chan et al., 2003; Chang et al., 2008) et le poisson zèbre (McWhorter et al., 2003). Ces anomalies peuvent être schématiquement regrouper en trois principales catégories : des défauts d'immaturité, de dénervation et des défauts d'accumulation de neurofilaments (NF) (**Figure 31**).

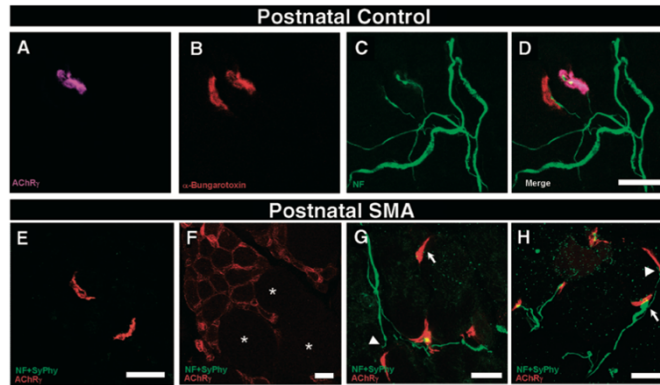


**Figure 31 : Schémas représentant l'altération de la NMJ dans la SMA.** (A) Dans des conditions où la quantité de SMN est normale, la NMJ est mature, avec une morphologie de type bretzel et une activité synaptique fonctionnelle. La reconstruction montre de fines fibres NF-positives (vert) innervant les NMJ (rouge). (B) Dans la SMA, le manque de SMN altère le transport axonal, on trouve les NF accumulés au niveau de la NMJ, affectant leur maturation et leur innervation, et par conséquent leur fonction synaptique (*Boido and Vercelli, 2016; Valsecchi et al., 2015*).

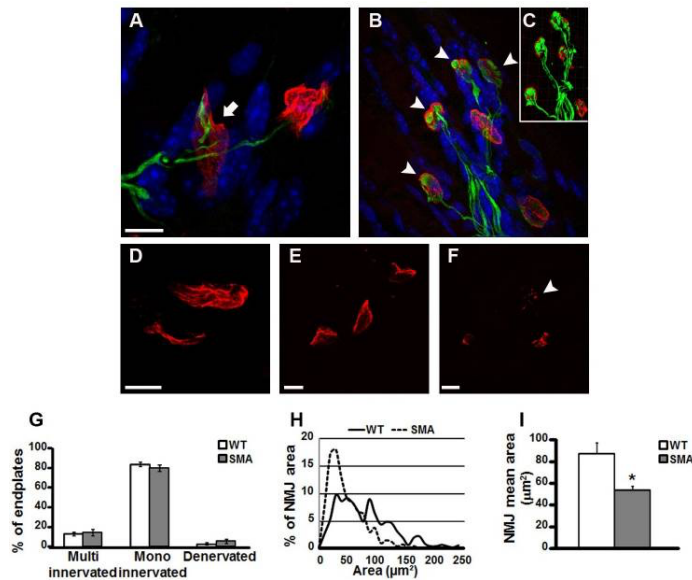
- **Immaturité de la NMJ SMA**

Chez les patients SMA de type I, une diminution de la surface et du nombre de perforations de la NMJ ainsi qu'une expression anormale des sous-unités fœtales  $\gamma$  des AChR ont été décrits (**Figure 32**) (Harding et al., 2015; Martínez-Hernández et al., 2014).

Différentes études sont arrivées à la même conclusion dans le modèle de souris SMN $\Delta$ 7 montrant des anomalies de morphologie de la NMJ. En effet, les NMJ sont immatures, avec une diminution des plaques perforées en formes de « bretzel », elles sont significativement plus petites par rapport aux souris contrôles, et parfois fragmentées (**Figure 33**) (Cifuentes-Diaz et al., 2002; Kariya et al., 2008; Kong et al., 2009; Ruiz et al., 2010; Valsecchi et al., 2015). La forme fœtale  $\gamma$  des AChR est encore exprimée à des stades tardifs de développement chez les souris SMA (Kariya et al., 2008). De plus, au 14<sup>ème</sup> jour postnatal (P14), 50 % des NMJ SMA sont immatures, contre 10 % des témoins.



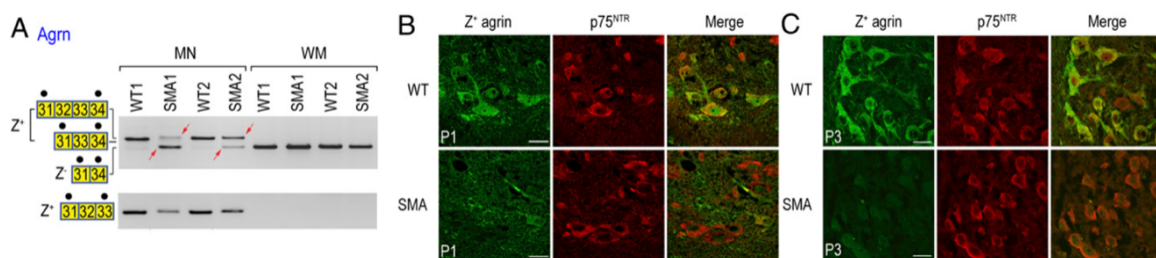
**Figure 32 : Échantillons de NMJ postnataux issues de patients contrôles et SMA de type I.** (A–D) NMJ issue de patient contrôle immunomarqués par AChR $\gamma$  (en fuchsia),  $\alpha$ -bungarotoxine (en rouge) et NF (en vert). L'expression de la sous-unité  $\gamma$  fœtale des AChR a été à peine observée dans les NMJ isolées. (E–H) Représentation morphologique de NMJ immunomarquées par AChR $\gamma$  (en rouge) et NF et SyPhy (en vert) dans des échantillons issus de patients SMA postnataux (moins de 1 an) (Martínez-Hernández et al., 2014).



**Figure 33 : Architecture de la NMJ de quadriceps chez les souris contrôle et SMA à P10.** (A-B) Immunomarquage des protéines  $\alpha$ -bungarotoxine (rouge) et neurofilament (vert) dans les NMJ de quadriceps de souris WT (A) et SMA (B). (C) Représentation isosurface avec le logiciel Imaris. Barre d'échelle = 10 $\mu$ m. (D-F) Morphologie des NMJ à plus fort grossissement : les souris WT présentent des plaques d'extrémité avec une morphologie plus mature (D), par rapport aux souris SMA (E). De plus, les quelques NMJ SMA formées semblent fragmentés (pointe de flèche – F). Barre d'échelle = 10 $\mu$ m. (G) Quantification des plaques motrices multi-innervés, mono-innervés et dénervés dans les quadriceps de souris WT et SMA. (H) Distribution de l'aire des NMJ dans la condition WT (ligne continue) et SMA (ligne pointillée). (I) valeur moyenne de la surface de NMJ dans les quadriceps WT et SMA (Valsecchi et al., 2015).

D'autres études, ont également montré que le modèle expérimental SMN $\Delta$ 7 SMA présente des altérations en ce qui concerne le développement de la NMJ, en effet, l'ARNm de

l'agrine Z+ (nécessaire à la maturation du NMJ) est considérablement réduite dans les motoneurons SMA (**Figure 34**) (Zhang et al., 2013). De plus, la dérégulation à la hausse de l'agrine Z+ par une approche génétique (Kim et al., 2017) ou par un traitement pharmacologique (Boido et al., 2018) augmente la taille des fibres musculaires et l'innervation au niveau des NMJ des souris SMA. De même, l'administration d'un AAV9 couplé à DOK7 améliore également l'architecture des NMJ et réduit l'atrophie musculaire des souris *Smn2B/-* (Kaifer et al., 2020). Plus récemment, il a également été montré que l'activation de la kinase spécifique du muscle (MuSK) améliorerait l'innervation des NMJ et la taille des fibres musculaires dans ce même modèle de souris *SMNΔ7* (Feng et al., 2021). Ces résultats suggèrent que les défauts de NMJ peuvent être atténués en améliorant la maturation post-synaptique chez les souris SMA.



**Figure 34 : Le saut d'exon de l'agrine Z entraîne une diminution drastique des niveaux d'ARNm et de protéines de l'agrine Z+ dans les SMA MN.** (A) Présence du saut d'exon d'agrine Z dans les MN P1 SMA (flèches rouges : anomalies d'épissage). (B-C) La coloration par immunofluorescence a été réalisée pour détecter l'agrine Z+ dans les MN lombaires de souris P1 (B) et P3 (C) SMA (Zhang et al., 2013).

Une autre caractéristique démontrant un développement incorrect de la NMJ concerne la persistance de l'innervation poly-neuronale. Une telle condition est généralement associée aux stades précoces de la structuration de la NMJ, mais est fortement retardée chez les souris *SMAΔ7* (Lee et al., 2011). Ces altérations synaptiques pourraient être liées à la dénervation affectant les muscles SMA.

- **Dénervation de la NMJ SMA**

Chez les patients SMA de type II et III, la mesure de l'amplitude du potentiel d'action composé (CAMP) ou potentiel évoqué révèle des anomalies de NMJ, suggérant que ces anomalies fonctionnelles pourraient être, au moins en partie, postsynaptiques (Wadman et al., 2012; Weng et al., 2021).

La protéine SMN joue un rôle central dans la formation et la maturation de la NMJ à des stades de développement précoces. En effet, le *knock-down* de SMN chez les souris néonatales a induit un phénotype de maladie neuromusculaire sévère, alors que la diminution de SMN après P17, lorsque la maturation complète de la NMJ est établie, a eu un effet relativement faible (Kariya et al., 2014). Ce défaut de maturation, dû à la diminution de SMN, semble associé à une altération de la fonction synaptique des terminaisons nerveuses. En effet, des modèles de souris SMA sévères présentent des potentiels post-synaptiques ralentis et une

libération de neurotransmetteur évoquée réduite (Kariya et al., 2008; Ling et al., 2012; Ruiz et al., 2010; Ruiz and Tabares, 2014). La raison d'une telle transmission synaptique compromise pourrait être liée à un taux réduit de transport de la vésicule synaptique (SV2) et de la synaptotagmine (Syt), observé à P11 chez les souris SMN $\Delta$ 7 (Dale et al., 2011; Tejero et al., 2016).

- **Accumulation de neurofilaments (NF)**

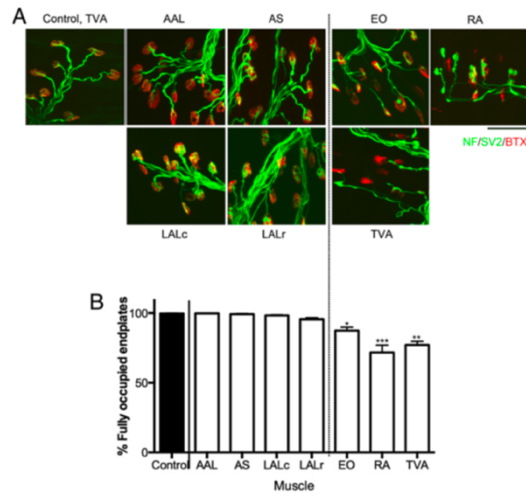
L'accumulation de neurofilaments (NF), résultant d'un dérèglement de la machinerie de transport axonal (Kreutzer et al., 2012), pourrait jouer un rôle dans la déstabilisation des NMJ. Il a ainsi été montré dans des modèles murins SMA sévères que la réduction de SMN entraînerait une perturbation du transport de l'ARNm de l'actine et affecterait la navette du NF dans l'axone du MN, conduisant à une accumulation aberrante de NF et à une mauvaise arborisation terminale (Bowerman et al., 2009, 2007). De plus, les niveaux de protéines de dynéine semblent être réduits, suggérant à son tour une altération du transport axonal (Dale et al., 2011). En effet, l'accumulation de NF est une caractéristique pathologique de la SMA, son accumulation a été associée au transport lent et retardé de composants essentiels à la maturation et au maintien des NMJ (Darras et al., 2019; Olsson et al., 2019; Torres-Benito et al., 2012).

#### 4.3. Vulnérabilité sélective des MN spinaux et de leur connectivité avec leur cible musculaire

La SMA se caractérise par une faiblesse des muscles proximaux chez le patient. Toutefois, alors que les muscle du biceps brachial, les muscles abdominaux latéraux et les muscles intercostaux internes sont retrouvés sévèrement touchés chez les patients SMA, le diaphragme, le muscle buccinateur et la langue, semblent quant à eux relativement épargnés (Kariya et al., 2008; Munsat and Davies, 1992). Cela a été bien caractérisé dans des modèles murins SMA, où l'atteinte sélective des muscles axiaux et appendiculaires corrèlent avec la perte des sous-types de MNs et semblent être associées à des altérations de NMJ (d'Errico et al., 2013; Ling et al., 2012; Murray et al., 2013, 2008).

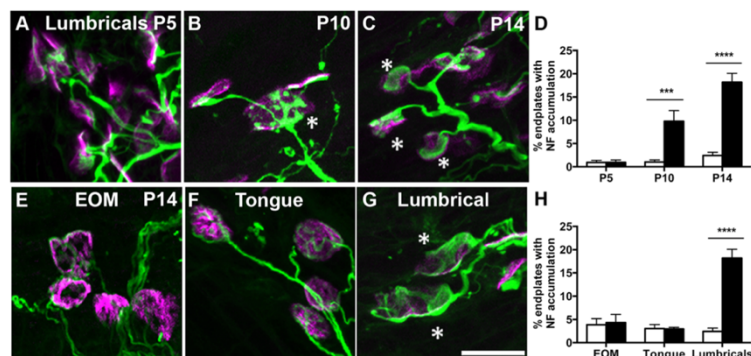
Il a été démontré dans des modèles murins SMA, que les motoneurons spinaux sont le type cellulaire le plus affecté dans la maladie (Harding et al., 2015; Petit et al., 2011). Les NMJ des motoneurons faciaux et hypoglosses restent quant à eux peu affectés dans les modèles murins de SMA (Comley et al., 2016; Murray et al., 2015, 2008). Les motoneurons oculaires, qui innervent les muscles extra-oculaires et contrôlent ainsi le mouvement des yeux, semblent systématiquement résistants dans la SMA et ce même chez des souris SMA en phase terminale (Comley et al., 2016).

Ainsi, dans la SMA, tous les sous-types de MNs et leurs NMJs ne seraient pas sensibles de la même manière à la SMA. Cependant, cette variabilité ne semble pas être liée à une différence d'expression de SMN (**Figure 35**) (Ling et al., 2012; Murray et al., 2015, 2008; Nichterwitz et al., 2020).



**Figure 35 : L'analyse de la jonction neuromusculaire révèle une vulnérabilité différentielle entre les muscles crâniens et abdominaux.** A) Les micrographies confocales montrent des jonctions neuromusculaires marquées à la bungarotoxine (BTX, rouge) et des anticorps contre le neurofilament et la protéine des vésicules synaptiques 2 (NF/SV2, vert). B) Quantification des plaques terminales innervées dans les muscles abdominaux [transversus abdominis (TVA), rectus abdominis (RA) et external oblique (EO)] par rapport aux muscles crâniens [levator auris longus (LAL), auricularis superior (AS) et adductor auris longus (AAL)] et les muscles contrôle (*Murray et al., 2015*).

Les causes spécifiques d'une telle sélectivité restent encore floues. D'autant plus que, plusieurs études se sont intéressées à la vulnérabilité des motoneurones dans différents modèles de souris SMA, mais avec des rapports contradictoires sur la sévérité de la dénervation suivant le modèle utilisé (**Figure 36**) (*Ling et al., 2012; Murray et al., 2015, 2008; Nichterwitz et al., 2020*). Toutefois, bien que l'origine précise de la vulnérabilité sélective de certains motoneurones et de leurs NMJ reste incertaine, elle démontre clairement que toutes les cellules, même du même type et de la même localisation, ne répondent pas de la même manière aux faibles niveaux de SMN (*Ahmad et al., 2016*).



**Figure 36 : Les protéines des neurofilaments s'accumulent de manière pré-synaptique dans les muscles lombaires, mais pas dans les muscles extra-oculaires ou de la langue chez les souris SMND7 SMA.** (A–C) Accumulations anormales de neurofilaments dans les terminaisons nerveuses pré-synaptiques des NMJ dans les muscles lombaires SMA au fil du temps et peuvent être vus à P10 (B) et P14 (C) (\*). (D) Augmente du pourcentage de plaque motrice avec une accumulation de

neurofilaments au cours du temps dans les muscles lombaires des souris SMA (barres noires) par rapport aux souris témoins (barres blanches). (E–G) Morphologie de la NMJ extra-oculaire (EOM, E) et du muscle de la langue (F) à P14 sans signe d'accumulation de neurofilaments, par rapport à une accumulation pathologique de neurofilaments dans les muscles lombaires (G) au même moment. (H) Quantification de l'accumulation de neurofilaments dans les muscles extra-oculaires, de la langue et lombaires chez les souris témoins et SMA (Comley et al., 2016).

En conclusion, même si les mécanismes sous-jacents restent encore mal compris, il existe un consensus général sur le fait que la rupture de la NMJ est un événement précoce dans la pathogenèse de la SMA, qui anticipe probablement un dysfonctionnement des MNs et l'apparition des symptômes moteurs. Dans cette mesure, la NMJ pourrait représenter une cible thérapeutique importante à exploiter pour contrer la progression de la pathologie. Alors que les défauts de l'unité motrice ont presque exclusivement été décrits dans des modèles animaux de la SMA et plus particulièrement les modèles murins, l'évolution dans le temps, et l'interdépendance des composants de la NMJ au cours de cette dégénérescence ne sont pas claires. Sur la base de ce constat, on peut souligner la nécessité de développer de nouveaux modèles pathologiques, robustes et pertinents, capables de reproduire la complexité de la SMA en vue d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Dans ce contexte, les progrès réalisés dans le domaine des cellules souches pluripotentes humaines a permis de proposer de nouvelles opportunités dont nous allons discuter dans le dernier chapitre de cette introduction.



## Chapitre III : Les cellules souches pluripotentes humaines

L'engouement de la communauté scientifique envers les cellules souches pluripotentes humaines (hPSC) s'explique par les deux propriétés cardinales qui les caractérisent. Tout d'abord, leur propriété d'auto-renouveau leur permet de se diviser à l'identique et de manière quasi-indéfinie, faisant de ces cellules une source illimitée de matériel. Deuxièmement, leur propriété de pluripotence rend ces cellules capables de se différencier, en théorie, tous les types cellulaires d'un organisme. En particulier, ces cellules sont capables de donner naissance aux trois lignages embryonnaires, à savoir l'endoderme, l'ectoderme et le mésoderme. Depuis l'isolement en 1998 des premières cellules souches pluripotentes humaines, à savoir les cellules souches embryonnaires humaines (hESC), les espoirs portés par ces cellules ont été grandement atteints, voir même dépassés. Comme nous le verrons dans ce chapitre, elles sont surtout devenues un outil incontournable à la fois pour la génération de nouveaux modèles cellulaires pathologiques mais également pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes visant en particulier la régénération tissulaire.

### 1. Obtention des cellules souches pluripotentes humaines

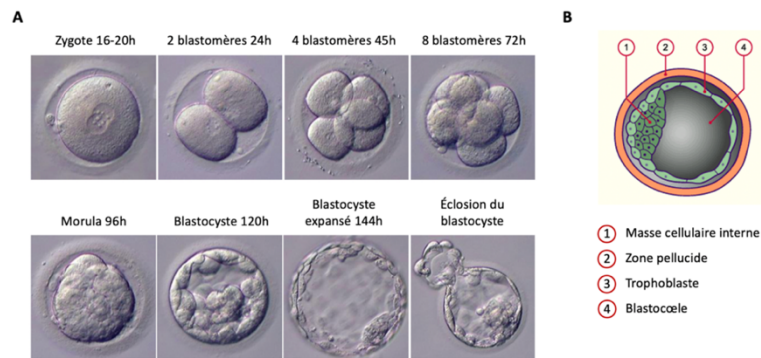
A ce jour, les hPSC proviennent de deux sources. Pendant une dizaine d'années, les cellules souches embryonnaires humaines (hESC) ont été l'unique source de hPSC. Ces cellules sont obtenues à partir d'embryons humains surnuméraires issus de fécondation *in vitro* (FIV) dans le contexte de programmes de procréation médicalement assistée (PMA) ou encore de diagnostics préimplantatoires (DPI). Beaucoup plus récemment, en 2007, le Professeur Shinya Yamanaka et son équipe ont identifié une alternative pour obtenir des hPSC. Cette deuxième source repose sur la conversion, par modification génétique, de cellules somatiques humaines en cellules présentant les deux propriétés cardinales des hESC, à savoir la capacité de pluripotence et d'auto-renouveau. Ces cellules ont ainsi été appelées cellules souches humaines induites à la pluripotence (hiPSC).

#### 1.1. Les cellules souches embryonnaires humaines

Les cellules souches embryonnaires (ESC) de mammifères ont été pour la première fois isolées, en 1981, à partir d'embryon de souris (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981).

Chez l'Homme, ces mêmes cellules (hESC) ont pu être isolées et cultivées dès 1998 (Thomson et al., 1998). Les auteurs ont prélevé ces hESC sur des embryons âgés de 5 à 7 jour après une fécondation *in vitro* (FIV), correspondant au stade blastocyste du développement embryonnaire (**Figure 37**). Le blastocyste est constitué en 3 parties, le trophoblaste périphérique qui donnera naissance à la plupart des structures extra-embryonnaires ; la masse cellulaire interne (MCI) qui est constitué de cellules souches embryonnaires, capables de donner à elles seules l'organisme entier ; et enfin une grande cavité remplie d'un liquide

appelé blastocèle qui disparaîtra progressivement au cours du développement embryonnaire. C'est à partir de la MCI du blastocyste, et plus particulièrement de l'épiblaste, que les premières cellules hESC ont été isolées. En effet, la MCI est composée de deux structures, l'hypoblaste qui donnera naissance à l'endoderme pariétal (ou sac vitellin) et l'épiblaste qui se situe plus en profondeur et qui est constitué de cellules pluripotentes.



**Figure 37 : L'embryogénèse, l'origine des cellules hES. A.** Cinétique de développement d'un embryon humain *in vitro*. **B.** Représentation schématique de la structure d'un blastocyste. *Adapté du site internet : Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français (CNGOF).*

*In vitro*, les hESC ont ensuite été « domptées » en suivant des méthodes proches de celles utilisées précédemment chez la souris. Ces cellules se présentent sous la forme de colonies plates. Pour conserver leur pluripotence, elles ont besoin de facteurs extracellulaire mais différents des mESC, il s'agit ici du facteur bFGF (basic fibroblast growth factor) et de la voie activine/nodal (Thomson et al., 1998). Depuis les 20 dernières années, les méthodes de dérivation et de culture ont beaucoup évolué permettant même aujourd'hui de générer dans des conditions GMP (Good Manufacturing Practice) des lignées d'hESC de grade clinique et dont les conditions de culture ne comportent aucun facteur xénogène, critère nécessaire pour leur utilisation en thérapie cellulaire (Ilic and Ogilvie, 2017; Tannenbaum et al., 2012).

Parallèlement, des lignées d'hESC ont été dérivées à partir d'embryons générés dans le cadre de diagnostic préimplantatoire (DPI). Bien qu'on dénombre entre 6000 et 8000 maladies génétiques, le DPI n'est autorisé que pour 243 maladies aujourd'hui (Rapport d'activité de DPI). A ce jour, seuls 190 lignées d'hESC porteuses de mutations ont été publiées représentant environ 30 maladies génétiques (Ben-Yehudah et al., 2012).

L'utilisation des hESC a toujours soulevé des questions éthiques et leur manipulation en France est régi depuis 1994 par les Lois de Bioéthique. Ainsi, la recherche sur l'embryon et l'utilisation des hESC a été interdite jusqu'au 6 août 2004, date à partir de laquelle une révision de la Loi de Bioéthique a autorisé leur utilisation dans certaines conditions très strictes. La recherche sur les hESC dépendait ainsi d'une dérogation accordée par l'agence de la biomédecine avec un moratoire de 5 ans. Pour pouvoir bénéficier de cette dérogation et travailler sur les hESC, comme à I-STEM, les projets de recherche devaient être « *susceptibles de permettre des progrès thérapeutiques majeurs et cette recherche ne pouvait pas être poursuivie par une méthode alternative d'efficacité comparable, en l'état des connaissances*

*scientifiques* » (Loi de Bioéthiques, 6 août 2004). Depuis 2004, les lois de Bioéthique ont été révisées en 2011 puis 2013 pour aboutir à un assouplissement du système d'interdiction avec dérogation, qui a été remplacé par un système d'autorisation encadré par l'agence de la Biomédecine. Bien que plus souple, cette nouvelle législation nécessitait que les programmes de recherche respectent quatre conditions : la pertinence du projet scientifique, la finalité médicale de la recherche, l'absence de techniques alternatives et le respect des principes éthiques. A la suite des états généraux de bioéthique, en 2019, une proposition de texte de loi a été votée permettant de passer d'un système d'autorisation encadrée à un système déclaratif et dont les décrets d'application devraient sortir d'ici peu (<https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000043884384>).

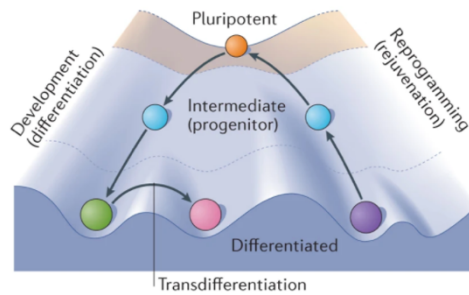
Bien qu'étant démontré comme une prouesse scientifique, l'utilisation des hESC est restée jusqu'à maintenant assez compliquée autant pour des questions bioéthiques et réglementaires que pour l'obtention du matériel cellulaire. Ainsi, la découverte des cellules souches humaines induites à la pluripotence (hiPSC) a permis de s'affranchir de telles limitations.

## 1.2. Les cellules souches humaines induites à la pluripotence

L'année 2007 a été consacré, par le prix Nobel de Médecine, Martin Evans, pionnier de la dérivation des cellules ES murines, et ses collègues Mario Capecchi et Oliver Smithies. Cette même année s'est achevée sur une prouesse scientifique toute aussi importante, celle de la génération des cellules souches humaines induite à la pluripotence (hiPSC) par l'équipe du Professeur Shinya Yamanaka.

### 1.2.1 *Autorenouveaulement des cellules pluripotentes : un processus très conservé*

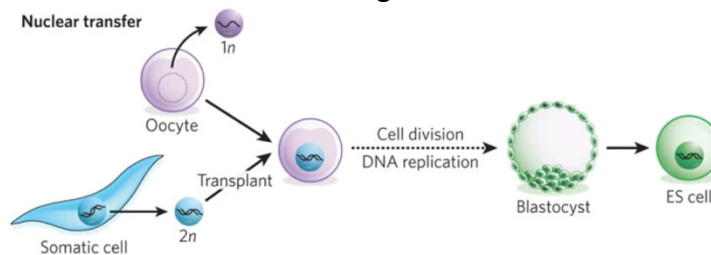
La découverte des iPSC repose initialement sur les travaux de John B. Gurdon avec l'émergence du concept de pluripotence. On a longtemps pensé que lorsqu'une cellule se différencie, elle inactive définitivement les gènes dont elle n'a plus besoin. Pourquoi une cellule spécialisée conserverait-elle la possibilité de réactiver des gènes spécifiques d'un autre type cellulaire ? Cela semblait être un mécanisme risqué, laissant la possibilité à des gènes d'être activés de manière inappropriée. Pourtant, trois approches de reprogrammation (le transfert nucléaire, la fusion cellulaire et la reprogrammation par induction) ont montré de manière concluante que le destin cellulaire peut être inversé, ramenant la cellule à un état embryonnaire. C'est ainsi que sont apparues les notions de plasticité du devenir cellulaire et d'état intermédiaire de différenciation (**Figure 38**).



**Figure 38 : Schéma représentant la plasticité du devenir cellulaire.** Une série d'expériences marquantes a montré que le destin des cellules est flexible et réversible. On sait maintenant que les cellules peuvent, en fait, passer d'un état différencié à un état pluripotent au cours d'une reprogrammation (Takahashi and Yamanaka, 2016).

- **Transfert nucléaire**

Le transfert nucléaire consiste à transférer le noyau d'une cellule somatique dans des œufs énucléés (Figure 39). Les expériences pionnières de clonage par transfert nucléaire, en 1952 d'abord, par Robert Briggs et Thomas King chez les amphibiens (Briggs and King, 1952), puis en 1962 par John Gurdon, ont permis de montrer que le transfert d'un noyau issu de cellule intestinale de têtard dans des ovocytes de Xénope non fécondés pouvait aboutir au développement d'un clone de têtard normal (Gurdon, 1962; Gurdon and Uehlinger, 1966). Il faudra attendre plusieurs dizaines d'années pour observer les premiers exemples réussis de clonage par transfert nucléaire chez les mammifères avec la célèbre brebis Dolly et la vache Marguerite (Wilmut et al., 1997). Chez l'homme, la perspective de générer des cellules souches pluripotentes par transfert nucléaire a fait l'objet de communications controversées, mais aucune n'a abouti à la dérivation d'une lignée de cellules souches.

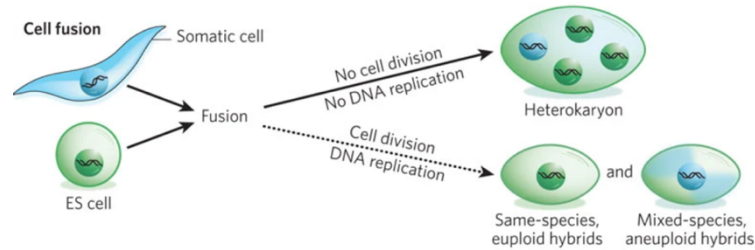


**Figure 39 : La reprogrammation par transfert nucléaire** (Yamanaka and Blau, 2010).

- **La fusion cellulaire**

Une autre stratégie de reprogrammation des cellules somatiques repose sur leur fusion avec des cellules souches (Figure 40). A partir de 1976, Miller et Ruddle ont montré que les thymocytes fusionnés avec des cellules de carcinome embryonnaire devenaient pluripotents (Miller and Ruddle, 1976). Dans les cellules tétraploïdes obtenues, les gènes marqueurs des cellules ESC tels que Oct3/4 acquièrent un état épigénétique caractéristique de la pluripotence en adoptant les schémas de méthylation de l'ADN et de modification des histones normalement observés dans les cellules ESC (Kimura et al., 2004; Tada et al., 2001; Terada et al., 2002; Ying et al., 2002). De plus, la transplantation de ces cellules dans des souris

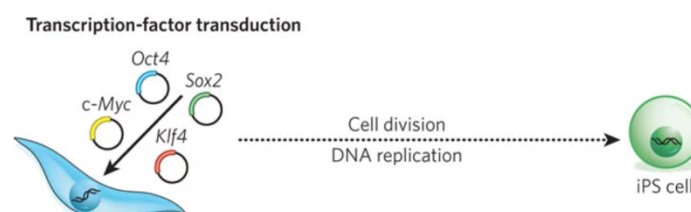
nudes entraîne la formation de tératomes, tumeurs embryonnaires, confirmant la pluripotence de ces cellules. La reprogrammation par fusion avec des cellules ES humaines a finalement été rapportée en 2005 (Cowan et al., 2005; Yu et al., 2006). Ces modèles ont ainsi montré que des facteurs contenus dans les cellules ES non seulement maintiennent l'état indifférencié, mais surtout sont capables de l'induire à partir de cellules différenciées, soulignant une fois de plus l'importance du contrôle épigénétique et l'expression des gènes de pluripotence dans la reprogrammation.



**Figure 40 : La reprogrammation par fusion cellulaire (Yamanaka and Blau, 2010).**

- **La reprogrammation par induction**

Le fait que les noyaux des cellules somatiques puissent être reprogrammés par transfert dans des ovocytes ou fusion avec des cellules ESC indique que les ovocytes et les cellules ESC contiennent des facteurs de reprogrammation (**Figure 41**). C'est sur ce postulat qu'une équipe japonaise a découvert, en 2006, comment reprogrammer des cellules somatiques de souris (fibroblastes) en cellules pluripotentes (appelé iPSC, *induced pluripotent stem cell*), par l'expression forcée de 4 facteurs de transcription (OKSM) : Oct3/4, Klf4, Sox2 et c-Myc (Takahashi and Yamanaka, 2006). Cette combinaison de facteurs a été identifiée après le criblage de 24 gènes candidats et de leur combinatoire en utilisant comme marqueur l'expression d'un gène spécifique de l'état de pluripotence chez la souris : *Fbx15*. Parmi ces 4 facteurs nécessaires et suffisant pour reprogrammer des cellules somatiques en iPSC, Oct3/4, Klf4 et Sox2 ont été décrits comme des régulateurs positifs de la pluripotence alors que c-Myc serait un inhibiteur des gènes de l'identité cellulaire (Sridharan et al., 2009). L'année suivante, en 2007, cette même équipe a réussi à étendre ce protocole à des fibroblastes adultes humains permettant de générer la première lignée de cellules iPS humaines (hiPSC) (Takahashi et al., 2007). Quelques mois plus tard une équipe américaine a également décrit la génération de cellules iPSC humaines mais avec une combinaison de facteurs partiellement différente : Oct3/4, Sox2, Nanog et Lin28 (Yu et al., 2007). L'ensemble des travaux du Pr. Yamanaka seront récompensés par le Prix Nobel de médecine en 2012, en particulier pour avoir fait voler en éclat un dogme de la biologie : les cellules somatiques sont réversibles et peuvent être reprogrammées en cellules souches pluripotentes.



**Figure 41 : La reprogrammation par induction** (Yamanaka and Blau, 2010).

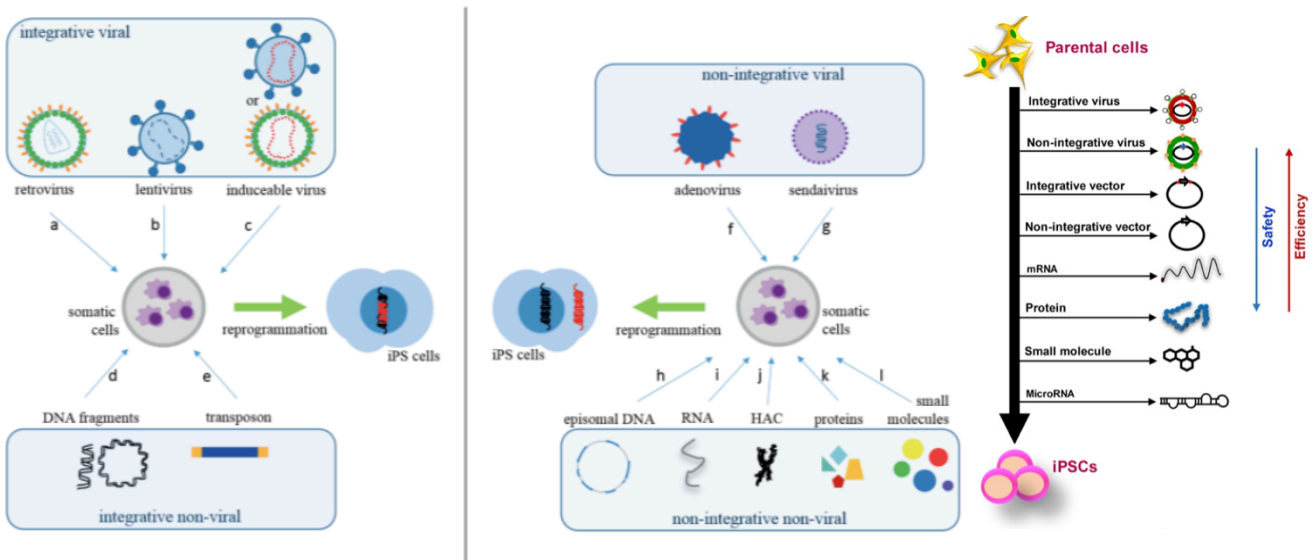
1.2.2 Les méthodes de reprogrammation

- **Les hiPSC une méthode alternative**

Dès leur première description, les iPSC humaines sont apparues comme extrêmement prometteuses pour diverses applications biomédicales, que ce soit pour la thérapie cellulaire personnalisée, la modélisation pathologique combinée à l'identification de nouveaux composés thérapeutiques. Même si les méthodes de reprogrammation se sont énormément démocratisées ces dernières années, la génération de ces hiPSC relève quelques défis, tels que l'efficacité de la reprogrammation, et les risques associés à l'instabilité chromosomique.

- **La méthode de transfert de gènes**

Diverses méthodes ont été adoptées pour introduire les facteurs de reprogrammation et induire la pluripotence dans les cellules somatiques. Ces approches peuvent être classées suivant deux catégories : intégratives et non intégratives (**Figure 42**). Les premières expériences de reprogrammation utilisaient des vecteurs intégratifs, comme des lentivirus, qui impliquent l'insertion de matériel génétique exogène dans le génome de l'hôte et pouvant être à l'origine de mutations susceptibles d'altérer la fonction de certains gènes et donc perturber la physiologie et l'intégrité des cellules. Les approches non intégratives basés sur l'utilisation des ARNm, d'épisome ou encore du virus Sendai sont quant à elles privilégiées aujourd'hui car elles ne nécessitent pas de modification génétique permanente (Gois Beghini et al., 2020; Moradi et al., 2019).



**Figure 42 : Les méthodes de reprogrammation des cellules somatiques suivant la balance sécurité/efficacité.** Ces méthodes peuvent être classées suivant quatre catégories selon leurs critères intégratif et viral. Les méthodes virales intégratives sont les rétrovirus (a), lentivirus (b) rétro-lentivirus inductibles (c) ; et les méthodes non virales intégratives correspondent aux fragments d'ADN linéaires ou circulaires (d) ou aux transposons (e). Les méthodes non intégratives peuvent aussi être virales avec les adénovirus (f) ou le virus Sendai (g) ; ou non virales avec l'ADN épisomal (h), les ARN

(i), le chromosome artificiel humain (HAC) (j), les protéines (k) ou les petites molécules (l) (Gois Beghini et al., 2020; Moradi et al., 2019).

- **Origine des cellules somatiques**

Historiquement, les fibroblastes cutanés étaient la source cellulaire utilisée pour les premières descriptions de reprogrammation. Les kératinocytes, adipocytes ou hépatocytes ont également été utilisés démontrant que de nombreuses cellules somatiques peuvent servir à la génération des hiPSC, même si leur efficacité est différente (entre 0,1 et 1% suivant le type cellulaire) (Cai et al., 2010; Eminli et al., 2008; Malik and Rao, 2013). Cependant, le prélèvement de ces différents types cellulaires repose sur un acte chirurgical invasif. Il est aujourd'hui possible de différencier des cellules sanguines, ou encore des cellules d'urine, ce qui représentent des alternatives moins invasives pour les patients (Bento et al., 2020; Loh et al., 2010; Staerk et al., 2010).

## 2. Culture des cellules souches pluripotentes humaines

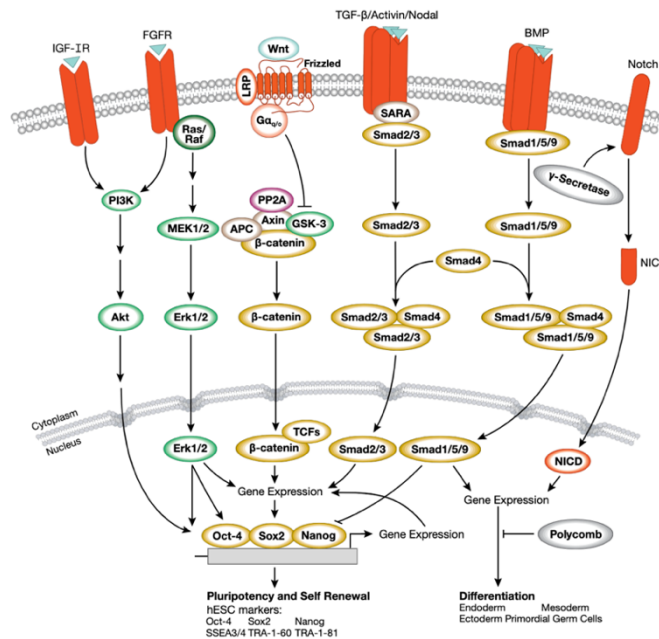
L'enjeu principal de la culture des hPSC, que ce soit pour les hESC ou les hiPSC, repose sur la conservation des deux propriétés cardinales de ces cellules, l'auto-renouvellement et la pluripotence, tout en préservant leur intégrité génomique.

### 2.1. Maintien de la pluripotence des hPSC

Au cours de la dernière décennie, diverses méthodes ont été développées pour la culture des hPSC. Trois facteurs clés ont ainsi été identifiés pour influencer la qualité et la robustesse des cultures : (i) le milieu de croissance, (ii) la matrice extracellulaire et (iii) les signaux environnementaux.

- **Le milieu de croissance**

Le maintien des CSP en culture repose sur l'utilisation de petites molécules permettant de contrôler la balance entre l'activation des voies de signalisation impliquées dans la pluripotence et l'inhibition des voies de différenciation. Ainsi, plusieurs molécules ont été identifiées comme facteurs de régulation de cette balance. En effet, des molécules comme le FGF2, l'Activine A et le TGF- $\beta$  permettent le maintien de la pluripotence en induisant l'expression des gènes de pluripotence Oct4, Sox2 ou encore Nanog (Eiselleova et al., 2008). Ceux-ci sont capables de s'autoréguler et forment une boucle de régulation de la pluripotence (**Figure 43**). Ainsi, le milieu de croissance est l'un des composants les plus critiques de la culture des hPSC et a subi une évolution importante depuis qu'il a été initialement utilisé pour la culture des hESC (Thomson et al., 1998). La première génération de milieu pour la culture des hESC contenait généralement du sérum KSR (*knock-out serum replacement*) et des cellules nourricières permettant la sécrétion de facteurs de croissance, de cytokines et de protéines de la matrice extracellulaire (Mallon et al., 2006; Thomson et al., 1998).



**Figure 43 : Voie de signalisation permettant le maintien de la pluripotence ou la différenciation des PSC** (<https://www.cellsignal.com/pathways/pluripotency-and-differentiation-pathway>).

- **La matrice extracellulaire**

L'objectif ultime pour une utilisation thérapeutique était de développer un milieu sans sérum, non-xénogénique, défini chimiquement, et adapté pour soutenir la croissance de presque tous les types de lignées hPSC. L'une des premières alternatives aux cellules nourricières a été l'utilisation du coating Matrigel. Le Matrigel correspond à une matrice de membrane basale, riche en collagènes (Kleinman et al., 1982). Bien qu'il soit largement utilisé à des fins de recherche, le Matrigel est un substrat xénogénique chimiquement défini et qui ne peut donc pas être utilisé pour des applications cliniques. D'autres polymères, telle que la Vitronectine, ont été utilisés et présentent l'avantage d'assurer une meilleure reproductibilité des cultures (Chen et al., 2011). Désormais, les hPSC sont majoritairement cultivées sur coating Matrigel ou Vitronectine, associés à des milieux de culture contenant des petites molécules ou cytokines permettant de moduler certaine voie de signalisation impliquées dans le destin cellulaire (Rivera et al., 2020).

- **Les signaux environnementaux**

Il existe un certain nombre d'indices environnementaux, y compris des indices provenant d'environnements physiques et physiologiques qui encouragent la croissance des hPSC, tels que la température, l'humidité, l'osmose, l'acidité, la rigidité des surfaces de croissance, la densité cellulaire, l'échange par diffusion gazeuse et les modes d'associations multicellulaires. Parmi ces différents facteurs, la consommation d'oxygène et les modes d'associations multicellulaires, sont deux facteurs clés qui influençant la croissance des hPSC. L'environnement physiologique du développement embryonnaire des mammifères à un stade précoce



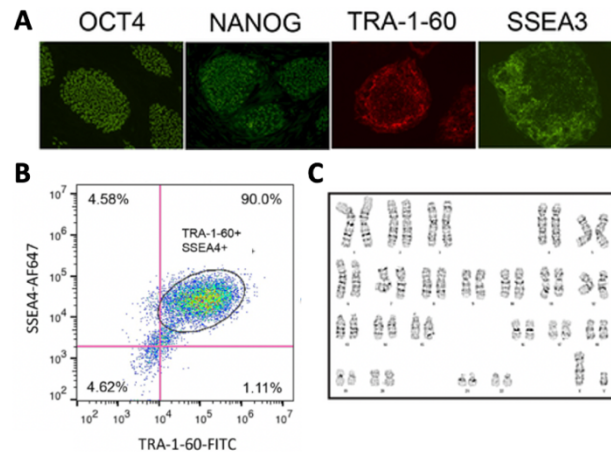
est hypoxique. La culture des hPSC doit ainsi être conçue pour imiter au maximum cette condition (Forristal et al., 2010; Forsyth et al., 2006). Les modes d'association multicellulaire ont un impact significatif sur la densité cellulaire, les interactions ligands-récepteurs et la transduction du signal intracellulaire des hPSC. Initialement, les hPSC étaient cultivées, manuellement à l'aiguille, sous forme de colonies et se différençaient spontanément sous forme d'agrégats de corps embryoïdes (EB). Avec la découverte des méthodes de dissociation enzymatiques (Chen et al., 2010; Ohgushi et al., 2010; Watanabe et al., 2007), nous pouvons maintenant cultiver des hPSCs en cellules uniques (Tsutsui et al., 2011), en monocouches de type non-colonie (Chen et al., 2012; Kunova et al., 2013) ou en suspension (Gerecht-Nir et al., 2004; Steiner et al., 2010; Ungrin et al., 2008).

## 2.2. Contrôle qualité de la pluripotence et de l'intégrité génomique des hPSC

Les hPSC étant de plus en plus utilisées à des fins cliniques, les procédures de contrôles qualités sont devenues extrêmement réglementées au cours des dernières années. Ces contrôles qualités concernent le maintien de la pluripotence et l'intégrité génomique des cellules. Afin de contrôler l'état de pluripotence de ces cellules, l'expression des facteurs de transcription tels que Nanog et Oct3/4 peuvent être suivie par des techniques et qPCR ou cytométrie en flux (**Figure 44A,B**). De même, de nombreux marqueurs de surface ont été identifiés comme associés à l'état indifférencié des hPSC, tels que SSEA3 et 4 (Stage Specific Embryonic Antigen), TRA-1-60 et 81 (Tumour Rejection Antigen), TRA-2-49 et 54 et GCTM-2 (Germ Cell Tumour Marker) (Mateizel et al., 2006). L'état de pluripotence de ces hPSC peut également être évalué *in vivo*. L'injection sous cutanée des hPSC dans des souris immunodéficientes aboutie à la formation de tératomes composés des trois feuilletts embryonnaires caractéristiques : l'endoderme, l'ectoderme et le mésoderme (Kim et al., 2009).

D'autre part, plusieurs études ont montré la présence d'anomalies chromosomiques importantes, et qui se trouvent être d'autant plus récurrentes que le nombre de passage est élevé. Ces anomalies sont majoritairement recensées sur les chromosomes 12, 17, 20 et X (Henry et al., 2019; Lefort et al., 2009). La prévalence des aneuploïdies dans les PSC en culture semble être déterminée par la sélection de gènes qui favorisent la survie pendant les périodes de stress cellulaire (Zhang et al., 2019). D'autre part, plusieurs mutations spontanées dans le gène *TP53* codant la protéine suppresseur de tumeur P53 ont été décrites (Avery-Kiejda et al., 2014; Lefort et al., 2009; Merkle et al., 2017). L'ensemble de ces études soulignent l'importance d'effectuer des contrôles qualités réguliers sur l'intégrité génomique de ces lignées d'hPSC et d'autant plus quand celle-ci sont destinées à la clinique. Pour ce faire, la technique du caryotype est la plus couramment utilisée pour déceler les anomalies chromosomiques telles que les aneuploïdies ou les polyploïdies (**Figure 44C**) (Assou et al., 2020). D'autres techniques plus sensibles existent, pour détecter les duplications et insertions chromosomiques, comme le mFISH (multicolor fluorescence *in situ* hybridization) ou les analyses de SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) (Steichen et al., 2019). Pour certaines applications, telle que la

vérification des lignées générées par la technologie CRISPR/Cas9, le séquençage complet du génome est nécessaire (Lund et al., 2012).



**Figure 44 : Caractérisation de colonies d'hiPSC *in vitro*.** A,B) Analyse des marqueurs de la pluripotence par (A) immunohistochimie avec les anticorps Oct4, Nanog, TRA-1-60 et SSEA3, et par (B) cytométrie en flux avec le double marquage SSEA4/TRA-1-60. C) Le caryotypage de la lignée d'hiPSC ne montre pas de défaut. *Adapté de (Yang et al., 2015).*

### 2.3. Le potentiel de différenciation

Les stratégies de conversion des hPSC en cellules d'intérêts reposent sur une vaste connaissance de la biologie du développement. Il existe deux méthodes de différenciation des hPSC, la différenciation par surexpression de facteurs intrinsèques ou par l'utilisation de petites molécules.

#### 2.3.1 *La différenciation par surexpression*

Des avancées dans les stratégies d'ingénieries cellulaires, telles que la conversion directe du destin cellulaire, ont démontré la faisabilité de manipuler les identités cellulaires par la surexpression de facteurs de transcription déterminant le destin cellulaire. La surexpression des facteurs de transcription peut se faire en administrant le gène via un vecteur viral intégratif ou non-intégratif, la transduction de protéines ou par un ARNm synthétique. Ces stratégies sont maintenant de plus en plus mises en œuvre pour la différenciation guidée des précurseurs neuraux.

Ces protocoles de différenciation par surexpression de facteurs de transcription présentent l'avantage d'être souvent courts (quelques jours) et de générer des cultures cellulaires relativement homogènes. Pour autant, cette technique interpelle quant au respect des processus de différenciation cellulaire et des conséquences physiologiques. En effet, au cours du développement, l'état de cellule différenciée et mature émerge au travers de plusieurs étapes intermédiaires. Ces résultats démontrent que cette technique de différenciation par surexpression de facteurs de transcription, bien que directe, présente certaines limites.

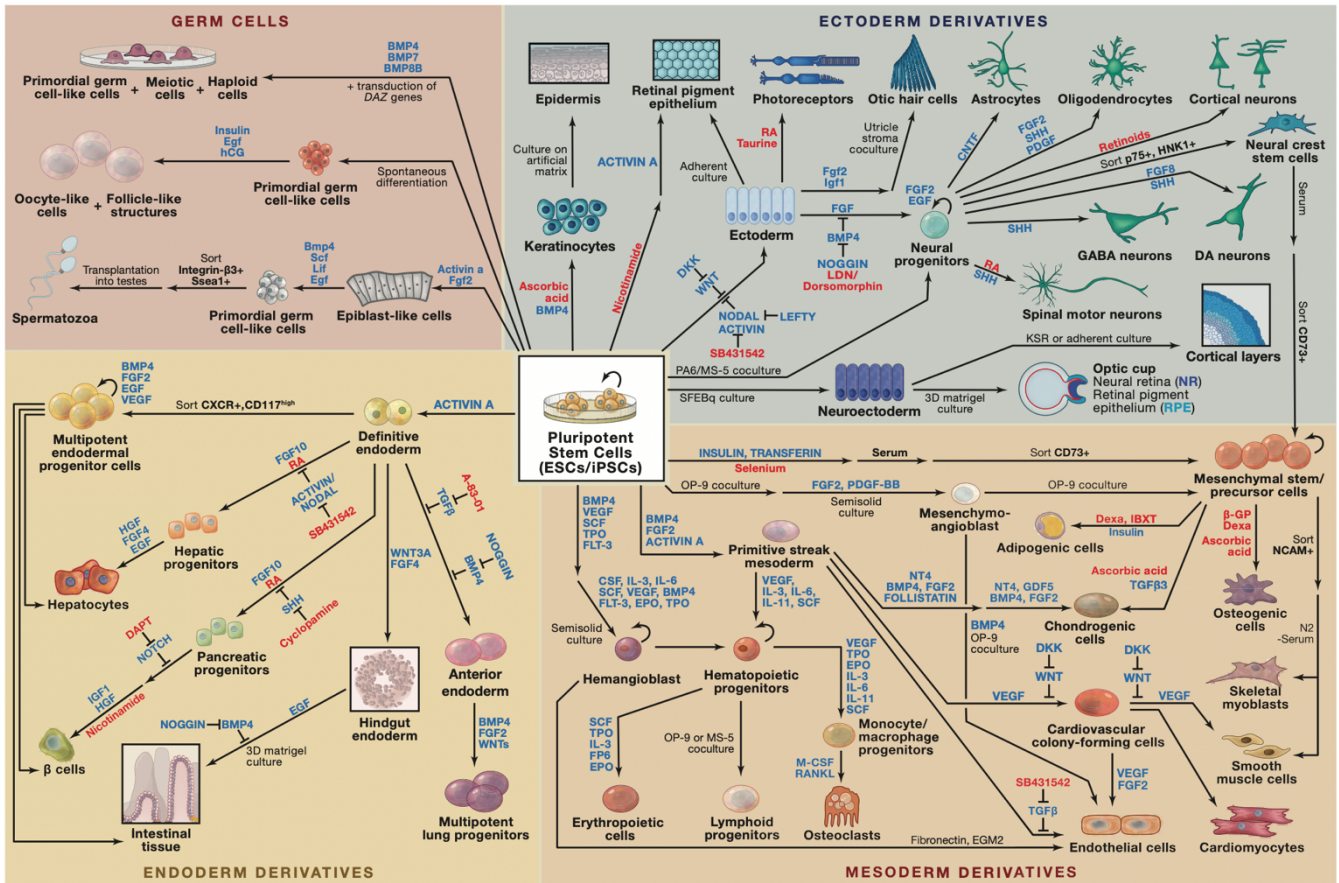


Figure 45 : Différenciation ciblée des cellules souches pluripotentes. Adapté de (Williams et al., 2012).

2.3.2 L'induction par facteurs de croissance et petites molécules

La différenciation dirigée des hPSC peut être enclenchée par l'utilisation séquentielle de facteurs de croissance et petites molécules activatrices et/ou inhibitrices de certaines voies de signalisations nécessaire au développement du type cellulaire d'intérêt. Cette approche vise à imiter fidèlement les différentes étapes du développement *in vivo*.

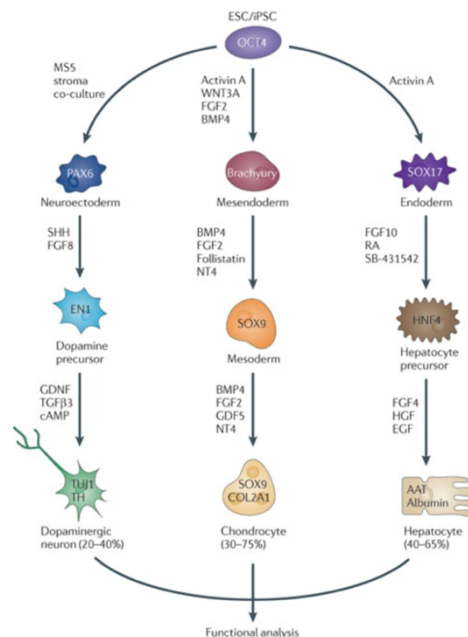
- Facteurs de croissances

Une première méthode efficace pour contrôler le destin cellulaire *in vitro* est l'ajout de facteurs de croissance recombinants dont le rôle est connu pour la différenciation vers le type cellulaire souhaité *in vivo*. Cette stratégie a été extrêmement efficace pour imiter les premières étapes du développement embryonnaire. En conséquence, la première étape dans de nombreux protocoles est la conversion des hPSC en cellules d'une des couches germinales souhaitées. De manière assez surprenante, différentes études sont arrivées à la même conclusion, seule une petite poignée de voies de signalisation sont nécessaires à la spécification des couches germinales, à savoir la voie du TGFβ, FGF, WNT et SHH (Moustakas and Heldin, 2009; Rao and Kühl, 2010; Turner and Grose, 2010). Bien que l'importance de ces facteurs au cours du développement embryonnaire soit connue depuis longtemps, la concentration de chaque facteur auquel une cellule en développement pourrait être exposée dans un embryon

et la période d'exposition ont été difficiles à déterminer (Borowiak et al., 2009; Kroon et al., 2008; Oldershaw et al., 2010; Yang et al., 2008).

Après une induction réussie de la couche germinale souhaitée, les facteurs de croissance protéiques et les molécules de signalisation, en combinaison avec des petites molécules, peuvent engager les cellules dans la voie de différenciation souhaitée (**Figure 46**). Bon nombre des mêmes voies de signalisation qui jouent un rôle dans la spécification des couches germinales jouent d'autres rôles dans la spécification des types cellulaires plus matures. Grâce à un titrage minutieux de la concentration et de la durée d'application des facteurs, et à l'utilisation combinatoire de facteurs protéiques, une grande variété de destins cellulaires peut être générée en utilisant un panel relativement étroit de protéines (Oldershaw et al., 2010; Perrier et al., 2004; Touboul et al., 2010).

Malgré leur application réussie à de nombreuses étapes des protocoles de différenciation dirigés, l'utilité à long terme des facteurs de croissance dans ces protocoles est sujette à caution. L'optimisation empirique des traitements par des facteurs de croissance est très laborieuse. De plus, des facteurs recombinants sont souvent produits dans des cellules bactériennes ou mammifères modifiées, dont les traces peuvent contaminer la préparation finale. Par conséquent, bien que les facteurs de croissance recombinants puissent être très utiles à des fins de recherche, d'autres méthodes peuvent, en fin de compte, être plus utiles et moins coûteuses, pour produire de grandes quantités de cellules adaptées à la thérapie.



**Figure 46 : Différenciation induite par facteurs de croissance et petites molécules** (Cohen and Melton, 2011).

- **Petites molécules**

Les composés chimiques offrent une alternative intéressante aux facteurs protéiques décrits ci-dessus (**Tableau 9**). Par rapport aux facteurs protéiques, les petites molécules sont moins chères, ont moins de variabilité d'un lot à l'autre, sont non immunogènes et sont plus

stables. Pour ces raisons, les cellules différenciées à l'aide de petites molécules pourraient être plus facilement envisagées pour la clinique que celles traitées avec des protéines recombinantes. Ainsi, l'idée de remplacer les facteurs biologiques par des facteurs chimiques dans les protocoles de différenciation a suscité un vif intérêt et trois approches principales ont été envisagées.

Tout d'abord, de nombreuses études ont démontré la faisabilité de substituer directement un facteur protéique par une petite molécule pour activer ou supprimer une voie de signalisation développementale donnée. Par exemple, les agonistes et antagonistes de la voie Hedgehog se sont révélés très efficaces pour la différenciation des motoneurones (Frank-Kamenetsky et al., 2002; Wichterle et al., 2002).

Ensuite, dans les cas où la voie biologique cible n'est pas connue, ou les molécules ciblant la voie souhaitée n'ont pas été identifiées, des approches de criblage chimique peuvent être utilisées pour identifier, de manière relativement impartiale, les molécules qui peuvent produire l'effet souhaité (Rubin, 2008). Cependant, une limitation importante au criblage chimique a été l'extrême difficulté à déterminer le mécanisme d'action des composés identifiés.

Molecule name	Function	Effect/use
Ascorbic acid	Not known	Dopamine and motor neuron differentiation Cardiac differentiation
Nicotinamide	Not known	Retinal pigment epithelium differentiation
Retinoic acid	Endogenous small molecule	Neuronal protocols Retinal protocols
Taurine	Endogenous small molecule	Retinal differentiation
PD173074	FGF inhibitor	Blocks endogenous caudalizing signals in motor neuron differentiation
SU5402	FGF inhibitor	Blocks otic induction
Hh.Agf.3	Hedgehog agonist	Induces motor neurons
C61414	Hedgehog antagonist	Blocks motor neuron induction
KAAD-cyclopamine	Hedgehog antagonist	Induces pancreatic cells from endoderm
LY294002	Phosphoinositide 3-kinase inhibitor	Enhances activin A signalling to generate endoderm
Indolactam V	Protein kinase C inhibitor	Induces pancreatic progenitors from endoderm
ALK inhibitor (SB-431542)	TGF $\beta$ signalling inhibitor (inhibitor of activin/Nodal signalling)	Neuron and hepatocyte differentiation
SIS3	TGF $\beta$ signalling inhibitor (inhibits SMAD3)	Otic induction

**Tableau 9 : Différenciation induite par les petites molécules (Cohen and Melton, 2011).**

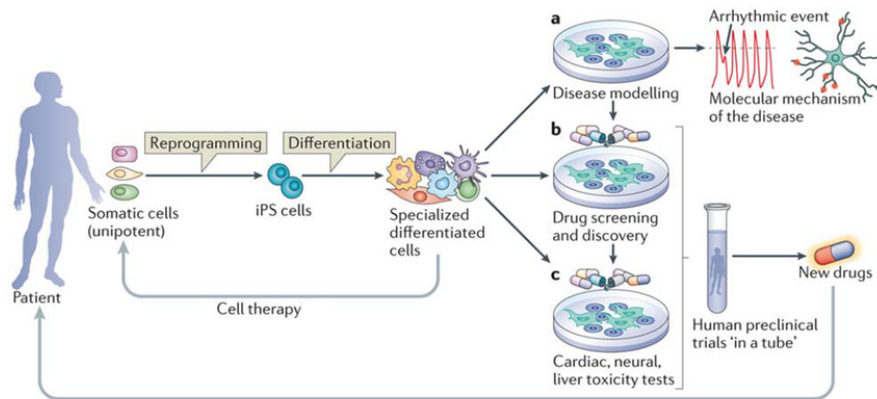
La génération de cellules entièrement différenciées à partir des hPSC a été un domaine de recherche très actif ces dernières années, permettant la publication de protocoles de différenciation toujours plus efficaces (Williams et al., 2021). Néanmoins, ces approches prennent du temps, la différenciation en neurones matures, par exemple, prend généralement entre 4 et 6 semaines (Tao and Zhang, 2016; Xie et al., 2013). La pureté des cellules obtenues peut également être insuffisante et nécessiter une étape intermédiaire de tri cellulaire, ce qui peut induire un biais de sélection. Enfin, que la différenciation soit réalisée par surexpression génique ou induite par des facteurs de croissance et/ou petites molécules, la caractérisation des cellules produites au cours du protocole de différenciation est indispensable. Cette caractérisation sera réalisée à différents niveaux : cellulaire, moléculaire et fonctionnel. Dans la partie 4, je détaillerai plus en détails les avancées et les caractérisations

des protocoles de différenciation pour l'obtention des neurones moteurs et leurs sous types ainsi que les cellules musculaires squelettiques à partir des hPSC.

La mise en place de la technologie des cellules hPSC a été une grande réussite scientifique, résultant de la convergence de divers courants scientifiques précédents tels que la « reprogrammation », les facteurs de transcription « maîtres » et les cellules souches embryonnaires. Son développement a également entraîné de nouveaux défis avec l'émergence des nombreuses applications biomédicales.

### 3. Applications biomédicales des cellules pluripotentes humaines

Les hPSC ne sont plus seulement utilisées dans le cadre de projet d'études développementales mais leurs objectifs ultimes sont aujourd'hui à des fins de thérapie cellulaire, de modélisation pathologique, d'identification de nouvelles stratégies pharmacologiques (**Figure 47**).



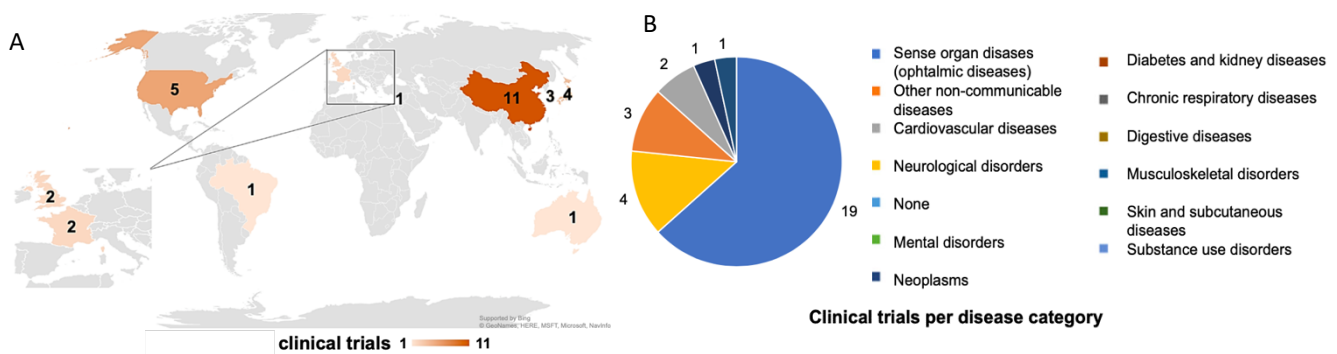
**Figure 47 : Application des cellules souches pluripotentes.** Les hiPSC, reprogrammées à partir de cellules somatiques d'un patient, peuvent être corrigées génétiquement, puis différenciées dans le type cellulaire d'intérêt, avant d'être transplantées chez le patient (thérapie cellulaire). Par ailleurs, les hiPSC peuvent être utilisées pour (a) la modélisation pathologique, (b) le criblage de molécules, (c) les tests de toxicité (Bellin et al., 2012).

#### 3.1. La thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire consiste à greffer des cellules différenciées à partir de hPSC dans le but de remplacer les cellules absentes, non fonctionnelles ou perdues dans le contexte d'une pathologie donnée. Il existe à ce jour deux stratégies : soit injecter des cellules saines différenciées préalablement à partir des hPSC ; soit injecter des cellules du patient qui auront été corrigées génétiquement, par thérapie génique ex-vivo, avant de les greffer en retour. Cette thérapie de médecine personnalisée présente l'avantage de s'affranchir de tout problème de rejet de greffe et de limiter l'utilisation d'immunosuppresseurs. Néanmoins, celle-ci reste coûteuse par rapport aux cellules thérapeutiques issues de banques. Les premiers essais cliniques utilisant les hPSC en thérapie cellulaire ont commencé il y a environ 10 ans, pour traiter les maladies telles que la dégénérescence maculaire, des lésions de la moelle épinière,

du diabète et de l'infarctus du myocarde (Kimbrel and Lanza, 2020). Ces essais ont montré que les thérapies à base de hPSC sont sûres et bien tolérées chez les patients.

A ce jour, on dénombre 30 essais cliniques impliquant des CSPh dont la majorité se basent sur l'utilisation d'hESC (22 essais) (Figure 48). En se concentrant sur les régions géographiques, la plupart de ces études ont été réalisées dans les pays asiatiques (Chine 36,7 %, Japon 13,3%, Corée du Sud 10,0%) et dans le domaine de l'ophtalmologie (Deinsberger et al., 2020). En France, on compte deux essais cliniques. Le premier a démontré la faisabilité d'utiliser des progéniteurs cardiovasculaires dérivées d'hESC et leur innocuité à court et moyen terme chez les patients présentant une dysfonction ventriculaire gauche ischémique sévère. A l'issue de cette étude, tous les patients présentaient une amélioration symptomatique avec une augmentation du mouvement systolique des segments traités par les cellules (Menasché et al., 2018). Plus récemment, STREAM, une étude de phase I/II, a été lancée par I-STEM, et vise à implanter des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien dérivées de hESC dans l'œil de patients atteints de rétinopathie pigmentaire, due à une mutation monogénique (Ben M'Barek et al., 2020).

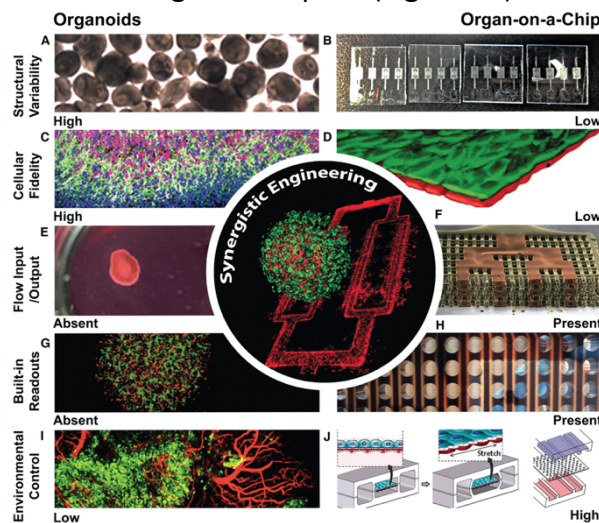


**Figure 48 : Tendances mondiales des essais cliniques impliquant des cellules souches pluri-potentes.** (A) Geographic distribution of studies involving human pluripotent stem cells. (B) Catégories de maladies ciblées dans les essais cliniques impliquant des cellules souches pluri-potentes humaines. Adapté de (Deinsberger et al., 2020).

### 3.2. Modélisation pathologique *in vitro* : la course au développement

Une autre application prometteuse des hPSC consiste à étudier l'impact des mutations causales de maladies génétiques sur la genèse, la maturation et la fonction de types cellulaires spécifiques affectés normalement durant le processus pathologique. Cette approche permet à la fois d'étudier les mécanismes responsables de la pathologie mais également de déterminer des phénotypes et biomarqueurs pertinents utilisables pour tester l'effet de molécules chimiques. De nombreux protocoles de différenciation ont ainsi été développés à partir des hPSC et permettent aujourd'hui d'avoir accès à un grand nombre de modèles cellulaires affectés dans des états pathologiques variés. *In vitro*, les modèles conventionnellement utilisés sont des modèles dit 2D en monocouche ou en co-culture, et permettent d'étudier la prolifération, l'expression de marqueurs ou encore les interactions cellules-cellules (Liu et al., 2018). Cependant, ces modèles 2D présentent des limitations importantes en raison du manque de

complexité dans la structure, la maturité, les interactions intercellulaires et le microenvironnement des tissus. Face à ce constat, on a pu assister à l'émergence de modèles cellulaires tridimensionnels (3D). Deux approches distinctes ont émergé au cours des dernières années : les organoïdes, et l'ingénierie des organes sur puce (**Figure 49**).



**Figure 49 : L'ingénierie synergique pour surmonter les limites des organoïdes et des organ-on-chips (Takebe et al., 2017).**

- **Les Organoïdes**

La capacité d'auto-organisation des hPSC au cours de processus de différenciation a permis le développement de ces structures multicellulaires en suspension, appelé organoïdes. Le principal avantage d'un organoïde est sa sophistication structurelle qui reproduit plus fidèlement le développement et microenvironnement de l'organisme humain. A ce jour plusieurs organoïdes humains ont été développés à partir des hPSC tels que la rétine (Lancaster and Knoblich, 2014), l'appareil digestif (Shah et al., 2016), les poumons (Miller et al., 2019), le rein (Nishinakamura, 2019), les vaisseaux sanguins (Wimmer et al., 2019), le cerveau (Chiaradia and Lancaster, 2020), la jonction neuromusculaire (Faustino Martins et al., 2020; Pereira et al., 2021). La plupart des tissus générés *in vitro* possèdent des phénotypes fœtaux et relativement immatures ; cependant, une série d'études ont montré que lors de la transplantation de ces structures complexes, ces dernières atteignent un certain niveau de maturité (Dong et al., 2021; Takebe et al., 2013; Zhang et al., 2021). Malgré ces progrès remarquables à des fins de modélisation pathologique, l'utilisation du modèle organoïdes pour des études à hauts débits est limité, ceci est au moins en partie dû à l'hétérogénéité présente au sein d'un même lot de production (Liu et al., 2018).

- **Approche d'ingénierie Organ-on-chip**

La technologie *Organ-on-chip* consiste à reproduire fidèlement les caractéristiques physiologiques d'un organe cible (intestins, alvéoles pulmonaires, foie...). Cette technologie en plein essor vise à associer un modèle cellulaire microfluidique 2D ou 3D avec un modèle de bio-ingénierie, utilisant des biomatériaux visant à reproduire la matrice extracellulaire

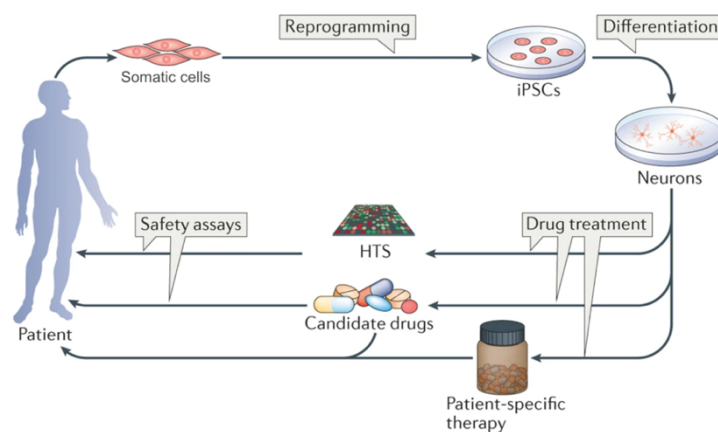


naturellement présente au sein du tissu. L'étude pionnière dans le domaine a été de créer un dispositif de poumon sur puce utilisant la lithographie douce classique et la microfluidique pour reproduire une interface alvéolo-capillaire fonctionnelle du poumon humain (Huh et al., 2011). Depuis cette première publication, le domaine a très rapidement évolué. Nous pouvons désormais regrouper largement ces approches en trois catégories distinctes : (i) la modélisation de la fonction de barrière au sein de chaque organe ; (ii) la modélisation de la fonctionnalité du tissu parenchymateux (Nunes et al., 2013; Zhang et al., 2016) ; et (iii) la modélisation de l'interaction systématique entre divers tissus (*body-on-chip*). Le système *body-on-chip* permet d'intégrer au sein d'un même système plusieurs compartiments d'organes ou de tissus pour simuler le corps humain (Sharma et al., 2020).

Cette technologie s'impose aujourd'hui dans divers domaines, en plus de la modélisation pathologique, tels que la validation de candidats médicaments et les tests de pharmacocinétique. Cependant, en termes d'hétérogénéités cellulaires, de fidélité phénotypique et de complexité physiologique, les organoïdes restent plus adaptés que les modèles *organ-on-chip*. Ainsi, la convergence de ces deux approches pourrait être le prochain challenge.

### 3.3. La découverte de nouveaux médicaments

Les modèles cellulaires basés sur l'utilisation des hPSC ont montré leur utilité dans la recherche ou la validation de composés thérapeutiques. Il existe deux stratégies principales pour l'identification de nouvelles molécules thérapeutiques : une approche à faible débit (*hypothesis-driven drug discovery*) ou à haut débit (HTS, *high Throughput Screening*) appelée également « ressource-driven » (**Figure 50**).



**Figure 50 : Utilisation des hiPSC dans la recherche de nouveaux composés thérapeutiques.**

Après l'établissement du modèle caractéristique de la maladie, trois stratégies sont couramment utilisées : le criblage à haut débit (HTS) de médicaments, l'approche médicament-candidat ou la thérapie spécifique au patient (Avior et al., 2016).

Pour la découverte de médicaments basée sur une hypothèse mécanistique, un petit groupe bien défini de composés sera testé sur les cellules affectées. Cette méthode convient

lorsque la voie de signalisation responsable du phénotype cellulaire est déjà connue, ainsi il sera possible de sélectionner spécifiquement les molécules capables de cibler cette voie de signalisation. Dans ce cas, seul un panel restreint de molécules est testé, souvent appartenant à une même famille. Si les composés à tester sont déjà validés et commercialisés pour une autre maladie, on parle de repositionnement de molécules. Ce repositionnement présente l'avantage que, les profils toxicologiques et la pharmacocinétique du composé étant déjà connus, le développement clinique peut aller beaucoup plus rapidement et à moindre coût. L'exemple d'une telle approche a été publié dans le cadre d'une maladie neuromusculaire appelé la Dystrophie Myotonique de type 1 (DM1) le repositionnement d'un antidiabétique, la Metformine, pour son effet sur des défauts d'épissage alternatif, dans un modèle de MPC (*mesodermal precursor cells*) dérivées d'iPSC DM1 (Laustriat et al., 2015) (**Tableau 10**). Dans le cadre de troubles neuromusculaires tels que l'amyotrophie spinale (SMA) et la sclérose latérale amyotrophique (SLA), l'utilisation de motoneurons dérivés de hPSC ont également conduit au dépistage de médicaments (Ando et al., 2017; Hawrot et al., 2020; Lee et al., 2018; McNeish et al., 2015; Ng et al., 2015; Sareen et al., 2012).

Le criblage par *High-Throughput-Screening* (HTS) ne nécessite quant à lui pas de sélection préalable pour initier la découverte de médicaments, car il permet de tester jusqu'à plus d'un million de composés par étude (Barmada et al., 2014). Cependant, le phénotype sur lequel sont testées les molécules doit être automatisable (plaque 96 ou 384 puits). De plus, les composés à tester peuvent être issus de différentes librairies chimiques commerciales appelées chimiothèques. Ces librairies peuvent contenir des molécules nouvellement synthétisées, des composés dont le mécanisme d'action est déjà connu ou encore des molécules repositionnables. Plusieurs études basées sur des modèles de hPSC ont montré la faisabilité de ce type d'approche pour différentes pathologies telles que des troubles neurologiques (Durens et al., 2020; Ruillier et al., 2020) ou la myopathie de Duchenne (DMD) (Shu et al., 2020).

	Médicaments	Pathologie	Administration	Entreprise	Référence
Validation	Risdiplam	SMA	Petite molécule	Roche	(Naryshkin et al., 2014)
Isolation	BMS-986168	Alzheimer	Anticorps	Bristol-Myers Squibb	(Bright et al., 2015)
Repositionnement	Ezogabine	ALS	Petite molécule	GlaxoSmithKline	(McNeish et al., 2015)
	Bosutinib	ALS	Petite molécule	Université de Kyoto	(Imamura et al., 2017)
	Metformine	DM1	Petite molécule	I-STEM	(Laustriat et al., 2015)

**Tableau 10 : Découverte de médicaments basé sur l'utilisation des hiPSC.**

#### 4. Utilisation des hPSC pour la modélisation de maladies neuromusculaires

L'amyotrophie spinale (SMA) étant une maladie neuromusculaire, il est primordial d'avoir accès aux cellules qui composent la jonction neuromusculaire, à savoir le neurone moteur et sa cible musculaire squelettique, afin d'étudier les effets de la mutation dans des cellules non accessibles chez le patient mais pouvant être produites à partir des hPSC.

##### 4.1. Obtention des cellules d'intérêt de la jonction neuromusculaire

#### 4.1.1. Les motoneurones

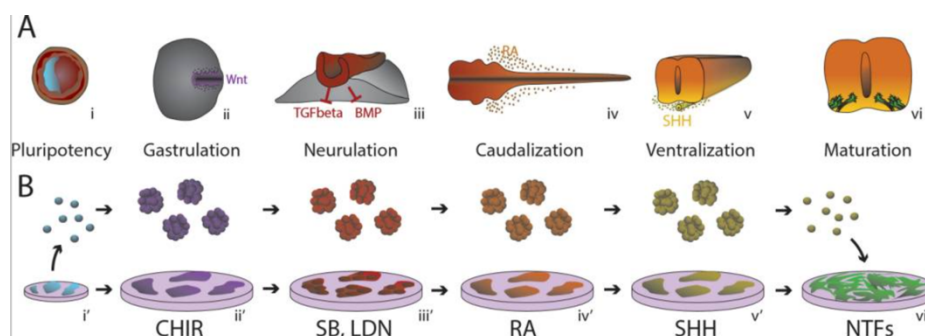
Bien que souvent considérés comme un seul et même groupe, les motoneurones sont très divers en termes de morphologie, de connectivité et de propriétés fonctionnelles. De plus, en fonction des pathologies, différents sous-groupes seront plus particulièrement touchés. Les motoneurones de différentes classes et sous-types sont regroupés en pools, dont chacun innerve un seul muscle squelettique. Dans de multiples contextes dégénératifs, comme la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) ou la SMA, certaines unités motrices dégénèrent précocement, tandis que d'autres sont remarquablement préservées. Les mécanismes extrinsèques et intrinsèques qui leur confèrent cette résistance sont encore mal connus mais présentent des cibles thérapeutiques prometteuses.

Toutefois, la quasi-totalité de ces observations proviennent de modèles murins (An et al., 2019; Comley et al., 2016; Ling et al., 2012; Murray et al., 2015, 2008; Nichterwitz et al., 2020). Ainsi, diriger la différenciation des hPSC en motoneurones et plus particulièrement en sous-type de MN permettrait de développer de nouveaux modèles pour étudier cette sensibilité différentielle.

C'est à partir de 2002 que le premier protocole de différenciation de cellules souches pluripotentes de souris en motoneurones a été établie (Wichterle et al., 2002). Cette étude montre la possibilité de générer des motoneurones fonctionnels en jouant sur un cocktail de cytokines dont l'acide rétinoïque (RA) et la voie Sonic Hedghog (SHH). Depuis, de nombreux autres protocoles ont été publiés et transposés aux cellules humaines issus de hPSC dérivées de patients sains ou porteurs de maladies neuromusculaires (Sances et al., 2016). Ces protocoles tentent d'imiter le développement embryonnaire, où l'activation de certaines voies de signalisation et de facteurs de transcriptions vont mener à la spécification des motoneurones. Les protocoles partagent trois étapes fondamentales à savoir : l'induction neurale par inhibition double-SMAD, la caudalisation par exposition au RA, et la ventralisation par activation de la voie SHH (**Figure 51**).

- L'induction neurale : la neuralisation correspond à l'induction des hPSC en cellules progénitrices neurales. Dans la majorité des protocoles publiés, cette étape passe soit par la formation de rosettes soit la formation d'EBs. La première méthode correspond à des cellules adhérentes à fort taux prolifératif, considérées comme des cellules souches neurales, elles pourront donner tous les types de neurones et de cellules gliales sous l'induction de morphogènes adaptés. L'induction neurale est influencée par les voies de signalisation BMP/TGF- $\beta$ . Cette étape de neuralisation débute généralement avec l'utilisation du SB431542 et LDN193189 qui ont pour effet d'inhiber ces deux facteurs (Chambers et al., 2009). Cette inhibition double-SMAD permet la spécification neuronale, comme indiqué par un pourcentage élevé de marqueurs progéniteurs neuronaux, Pax6 et Sox2. L'enrichissement précoce de Pax6/Sox2 à son tour réprime intrinsèquement les destins du mésoderme et de l'endoderme, réduisant ainsi considérablement la durée des protocoles de différenciation et, surtout, l'apparition de types cellulaires non neuronales.

- La caudalisation et la ventralisation : Le neuroectoderme étant spécifié, les gradients de signalisation agissent maintenant comme des indices de position le long de l'axe rostro-caudal et dorso-ventral (Muhr et al., 1999). Plusieurs facteurs impliqués dans le développement interviennent aussi dans cette spécification. La caudalisation est d'abord assurée par une concentration élevée de l'AR, permettant le passage des cellules du mésencéphale à une identité spinale (Wichterle et al., 2002). En plus de l'AR, le FGF et Wnt sont également nécessaires pour l'induction des identités du cerveau postérieur caudal et de la moelle épinière (Nordström et al., 2002). Une autre molécule clé est la protéine de signalisation SHH qui détermine l'identité spinale dorso-ventrale et est sécrétée par la notocorde dans un gradient ventral le long de l'axe ventro-dorsal (Roelink et al., 1995). En revanche, l'identité dorsale est dictée par la signalisation BMP/TGF- $\beta$ . Cette étape va permettre la spécification en interneurones et motoneurones inférieures.



**Figure 51 : Étapes du développement des MN humains reproduit in vitro par l'ajout de petites molécules et de protéines recombinantes de signalisation (Sanes et al., 2016).**

Au-delà de ces principes de structuration communs, les protocoles de différenciation des MN à partir de hPSC ont montré que de subtiles différences dans le temps d'ajout de certaines cytokines, la durée et la composition du milieu peuvent fortement influencer le rendement, la pureté et le phénotype des MNs. Jusqu'à récemment, les phases de caudalisation et de ventralisation n'avaient pas été améliorées par rapport au protocole de différenciation initialement établi sur le modèle murin. En modifiant la concentration, l'ordre et le timing des signaux RA, Wnt3a, FGF2 et SHH au cours de la différenciation *in vitro*, l'équipe de Cécile Martinat, révèlent le rôle, auparavant sous-estimé, de la signalisation graduée de Wnt au cours du développement des MNs (Maury et al., 2015). L'activation de la voie Wnt permet la génération de 80% de MN progéniteurs exprimant le marqueur Olig2 (le facteur de transcription oligodendrocytes). Cette optimisation a également permis de diminuer drastiquement le temps de différenciation des hPSC en MN spinaux à 14 jours. De même, Du et al., ont montré que pour limiter la spécification des progéniteurs ventraux, exprimant NKX2.2, tout en favorisant la génération de progéniteurs Olig2, un cocktail de CHIR et de SB peut être appliqué pour atténuer l'effet du SHH (Du et al., 2015).

L'expression séquentielle des membres de la famille Cdx et Hox au cours du développement, appelée colinéarité, dicte l'identité rostro-caudale le long du cerveau postérieur et

de la moelle épinière (Dasen et al., 2005; Ensini et al., 1998; Philippidou and Dasen, 2013). Récemment, une étude, menée à l-STEM, a démontré la faisabilité de générer à partir de hPSC différents sous-types de MN spinaux le long de l'axe rostro-caudal en jouant sur les facteurs RA, SAG, FGF et GDF11 tant sur le timing que sur leur concentration (Mouilleau et al., 2021).

Des études générant des MN à partir des hPSC de patients atteints de SMA ont révélé des phénotypes spécifiques à la maladie, validant ainsi l'utilisation de ce système pour explorer les fondements moléculaires de la SMA et développer de nouvelles plateformes de criblage pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques (Ando et al., 2017) (**Tableau 11**). Cependant, certains défis clés demeurent, à savoir : comment comparer les nombreux protocoles existants pour la différenciation des MN spinaux ? ; comment établir des stratégies de différenciation dirigées pour les autres sous types de MN, comme les MN craniaux ? ; comment faire murer correctement les MN *in vitro*.

Citation	Time	Efficacy	Transgene free	Gene expression	IF	Electrophysiology	Functionality	Disease
Dimos, 2008	4 wk	20% HB9*	X		X			ALS
Karumbayaram, 2009	5 wk	33% ± 12% ISL1*	X		X	patch clamp	NMJ formation	
Ebert, 2009	4-8 wk	20-30% ChAT*	X		X			SMA
Chambers, 2009	20d	ND	x		X			
Hu, 2010	6 wk	10-23% HB9*	x		X	patch clamp	NMJ formation	
Hester, 2011	30-52d	72% HB9*/ ChAT*		X	X	patch clamp	NMJ formation	
Boulting, 2011	29d	10-20% ISL1*	X	X	X	Ca <sup>2+</sup> flux, patch clamp		ALS
Corti, 2012	24d	78,2% ChAT*/SMI32*	X		X		NMJ formation Transplantation in SMA mice	SMA
Egawa, 2012	35d	ND	X		X	Patch clamp	NMJ formation	ALS
Amoroso, 2013	3 wk	37% HB9*/ ISL1*	X	X	X	Ca <sup>2+</sup> flux, patch clamp	Transplantation in chick	ALS
Sareen, 2013	7 wk	33-45% SMI32*	X		X	patch clamp		ALS
Qu, 2014	20d	51,6% HB9*	x	X	X	Patch and voltage clamp	NMJ formation	
Kiskinis, 2014	24d	80% ISL1*/Tuj1*	X	X	X	patch clamp	Transplantation in chick	ALS
Maury, 2015	25d	80% ISL1*	X	X	X	patch clamp		
Du, 2015	16 days	95% ISL1*	x		X		Transplantation in chick	SMA /ALS
Shimojo, 2015	6 weeks	50% ISL1*	x	X	X		NMJ formation	
Lippmann, 2015	21 days	HOX patterning	X		X	patch clamp		
Ohuchi, 2016	70 days	40-50% HB9*	X	X	X			SMA
Ichiyanagi, 2016	44 days	20-30% ISL1*	X		X			ALS
Ando, 2017	56 days	ND	X		X			SMA
Goparaju, 2017	10 days	94,3% HB9*		X	X			
Lukovic, 2017	6 weeks	1% HB9*	x	X	X	current clamp		
Fujimori, 2018	40 days	60%	X	X	X			ALS
Sun, 2018	28 days	90% HB9*	X		X			ALS
Bianchi, 2018	21 days	73% HB9*	X		X	Ca <sup>2+</sup> flux, patch clamp		uniaxial strain ALS
Vandoorne, 2019	4 weeks	80% ISL1*	X		X	patch clamp		ALS

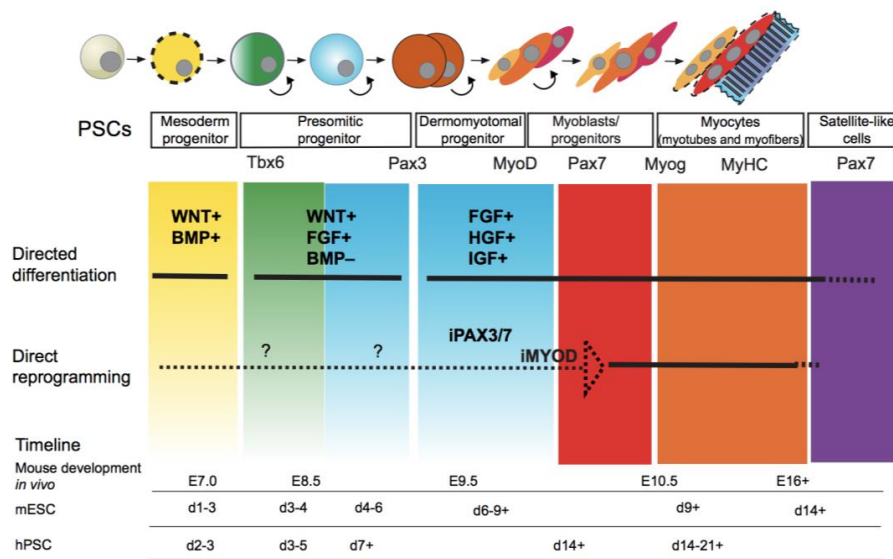
**Tableau 11 : Résumé des protocoles de différenciation de motoneurones à partir de cellules souches humaines induites à la pluripotence.**

#### 4.1.2. La cellule musculaire striée squelettique

On peut distinguer deux méthodes pour tenter de récapituler la myogenèse *in vitro* à partir des hPSC qui parfois peuvent être associées (**Figure 52**) : la différenciation forcée et la différenciation par induction à l'aide de petites molécules.

La différenciation forcée est la plus communément utilisée, et dépend de stratégies de surexpression de facteurs de régulation myogéniques. Parmi ces stratégies, les plus courantes utilisent la surexpression du facteur de transcription MyoD (Maffioletti et al., 2015) ou encore celle des facteurs Pax3/7 (Darabi and Perlingeiro, 2016; Filareto et al., 2015) dans des hiPSC.

Cela aboutit à une différenciation forcée des hPSC vers le lignage du muscle squelettique avec des cellules poly-nucléés et exprimant les marqueurs MHC (Myosin Heavy Chain), MyoD, MyoG (myogénine) et CD56 (Darabi et al., 2012; Goudenege et al., 2012; Tedesco and Cossu, 2012). Ces stratégies de reprogrammation directe présentent néanmoins des inconvénients importants, tels que l'insertion d'un transgène pouvant être responsable de recombinaison génomique ou de réactivation génique incompatible avec la thérapie cellulaire ; un contournement des étapes précoces du développement, étapes pouvant être critiques dans le cadre de l'étude de maladies développementales (Chal and Pourquié, 2017). Jusqu'à très récemment, l'obtention des cellules musculaires dérivés de hPSC se faisaient exclusivement par l'apport d'un transgène, la génération de protocoles *transgene-free* a longtemps représenté un véritable challenge (**Tableau 12**).



**Figure 52 : La différenciation myogénique à partir de CSpH.** Les deux méthodes d'obtention de cellules myogéniques sont schématisées ici. La différenciation dirigée permet de suivre les étapes du développement *in vivo* alors que la reprogrammation directe contourne les étapes précoces de la myogénèse. L'expression de certains facteurs de transcription (Tbx6, Pax3, Pax7, MyoD ou MyoG) et de certaines protéines spécifiques du muscle (Desmine ou MyHC) permettent de suivre le déroulement de la différenciation myogénique (Chal and Pourquié, 2017).

Plusieurs études ont ainsi tenté d'établir un protocole de différenciation en suivant cette stratégie, dite de *transgene-free*. Celle-ci repose sur l'utilisation de milieux supplémentés en cytokines ou petites molécules mimant l'effet de morphogènes. Parmi ces études, trois semblent plus prometteuses que les autres, notamment en raison de l'utilisation d'inhibiteurs GSK3- $\beta$ , permettant d'induire le mésoderme dans les étapes les plus précoces de la différenciation (Chal and Pourquié, 2017; Kodaka et al., 2017; Sakurai et al., 2012). Enfin, le protocole initialement commercialisé par Genea Biocells (Caron et al., 2016) présente quant à lui un réel avantage puisqu'il permet l'obtention de myotubes après seulement 25 jours de culture cellulaire. Cependant ce dernier ne permet pas de générer de cellules satellites PAX7+, contrairement au protocole du Pr. Pourquié. L'obtention de ces cellules dites "satellite-like" est important d'un point de vue thérapeutique car elles ont la capacité de se diviser de manière asymétrique, ce qui permet d'une part l'auto-renouvellement et d'autre part la génération de

myoblastes pouvant proliférer et contribuer à la régénérescence musculaire (Chal and Pourquié, 2017).

Citation	Time	Cell sorting	Cytokines	Transgene	Gene expression	IF	EM	Functionalité	Disease modeling
Goudenege, 2012	5 wk	x	x	MYOD1	x	x		transplantation in RAG mdx mice	DMD
Tedesco, 2012	4 wk			MYOD1	x	x			LGMD2D DMD
Darabi, 2012	2 wk	x	x	Pax7	x	x		transplantation in mdx mice	
Awaya, 2012	63d		x		x	x		transplantation in NOG mice	
Borchin, 2013	35d	x	x		x	x			
Tanaka, 2013	2 wk		x	MYOD1	x	x	x	transplantation in NOD/Scid-DMD mice	Myoshi myopathy
Abujarour, 2014	2 wk		x	MYOD1		x			DMD, BMD
Hosoyama, 2014	8 wk		x		x	x		sporadic muscle twitching	BMD, SMA, ALS
Skoglund, 2014	2-8 wk			Pax7		x	x	Electrophysiological studies, calcium flux	
Chal, 2015	4 wk	x	x			x		spontaneous twitching	DMD
Shoji, 2015	2 wk			MYOD1	x	x	x	Contractions under stimulation, calcium flux	DMD
Demestre, 2015	4 wk	x	x		x	x		Contraction under stimulation NMJ formation	
Maffioletti, 2015	3 weeks			MYOD1	x	x	x	transplantation in NOD/SCID mice	DMD, LGMD2D, LMNA, DM1
Dastidar, 2018	3D system							NMJ formation, Ca <sup>2+</sup> transient	
Choi, 2016	40d	x	x		x	x	x	transplantation in NRG mice spontaneous contraction	DMD, FSHD, ALS
Caron, 2016	26d		x		x	x			FSHD and BMD
Akiyama, 2016	5d			MYOD1	x	x		spontaneous contraction	
Hicks, 2017	50d	x			x	x	x	transplantation in NSG-mdx mice spontaneous contraction	DMD
Yoshida, 2017	10d			MYOD1	x	x			Pompe diseases
Jiwlawat, 2017	12 wk		x		x	x	x	spontaneous contraction	NMDs
Uchimura, 2017	15d			MYOD1	x	x			
Sakai-Takemura, 2018	10 wk	x	x		x	x		transplantation in NSG-mdx mice	CMS
Mondragon-Gonzalez, 2018	20d		x	Pax7		x			DM1

**Tableau 12 : Résumé des protocoles de différenciation de cellules musculaires à partir des hPSC.**

Bien que l'on puisse observer la présence de sarcomères très organisés, le niveau de maturité des myotubes obtenus *in vitro* à partir des hPSC reste toutefois limité. En effet, des analyses ultra-structurales ont montré, par exemple, que ces fibres musculaires ne parvenaient pas à former un réseau de tubules T mature et caractéristique des fibres musculaires adultes (Skoglund et al., 2014). En effet, sur la base de leurs caractéristiques morphologiques, ces myotubes dérivés des hPSC présenteraient davantage un phénotype fœtal ou périnatal. Outre le caractère immature intrinsèque des fibres, cette maturation incomplète pourrait également s'expliquer par le manque d'innervation et de vascularisation dans ces cultures cellulaires (Chal and Pourquié, 2017). Ainsi, des systèmes cellulaires plus complexes ont été développés, avec notamment la mise en place de systèmes tridimensionnels (3D) comme la génération d'un myocarde humain artificiel à partir de fibroblastes et de cardiomyocytes dérivés de hPSC contenus au sein d'un patch construit par impression 3D, permettant d'améliorer la maturation de ces cardiomyocytes (Tiburcy et al., 2017). Plus récemment, un tissu musculaire squelettique artificiel humain a été mis au point à partir de plusieurs types cellulaires dérivés d'hiPSC (cellules musculaires, motoneurones, péricytes et cellules endothéliales vasculaires) afin d'augmenter la complexité histologique (Maffioletti et al., 2018).

#### 4.2. Modélisation *in vitro* de la jonction neuromusculaire humaine

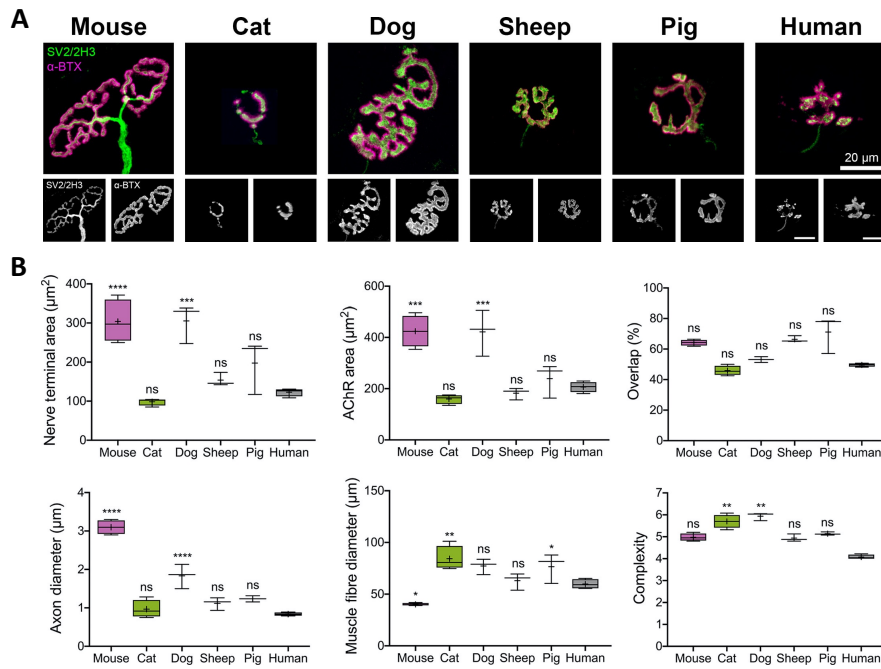
##### 4.2.1. *La jonction neuromusculaire - limite des modèles animaux*

Différents modèles et approches ont été développés pour décrypter les mécanismes impliqués dans la formation, le maintien et le fonctionnement des jonctions neuromusculaires (NMJ). Parallèlement, la prévalence et l'incidence des maladies neuromusculaires héréditaires nécessite le développement de modèles pathologiques pertinents pour déchiffrer la physiopathologie sous-jacente à ces maladies et développer des traitements efficaces (Bhatt, 2016). Le développement et le fonctionnement de la NMJ ont longtemps été étudiés sur la base de modèles animaux, telle que la souris (Wood and R. Slater, 2001). Bien que les modèles murins aient été cruciaux dans les premières études de modélisation pathologique de maladies neuromusculaires, ils présentent des limites importantes, telles que leur capacité à reproduire pleinement la physiologie de la NMJ humaine. Ces limites peuvent expliquer, d'une part les nombreux échecs de transpositions de certaines études chez l'homme, et d'autre part les difficultés quant à l'identification de voie de signalisation spécifiques (Boehm et al., 2020; Clerc et al., 2016; Dupuis and Loeffler, 2009). Les chercheurs ont tenté de surmonter ces obstacles en développant des modèles cellulaires *in vitro* humains plus pertinents.

Un certain nombre d'études utilisaient des modèles inter-espèces, également appelés modèles chimériques, et ont permis de confirmer que la formation et la fonction de la NMJ étaient, au moins en parti, conservées parmi une variété d'espèces allant de la grenouille aux rongeurs en passant par le poulet. En utilisant ces outils, Fischbach et ses collègues ont démontré que des co-cultures de cellules dissociées à partir de muscle squelettique et de moelle épinière produisaient des contacts synaptiques fonctionnels (Fischbach, 1970). Ces modèles de cultures cellulaires chimériques ont ainsi pu apporter des informations capitales sur la formation et la fonction de la NMJ.

Alors que le modèle murin était facilement utilisé pour des études de modélisation pathologique des maladies neuromusculaires, il a montré que la NMJ humaine présentait des caractéristiques particulières. A titre de comparaison avec la NMJ murine, la NMJ humaine est plus petite avec un axone plus fin, les terminaisons nerveuses présente une complexité réduite et une morphologie « nummulaire » alors qu'elle est dite en forme de « bretzel » chez la souris (**Figure 53**) (Jones et al., 2017). De plus, l'analyse de la taille des NMJ en fonction du poids de l'animal a montré que la NMJ humaine se rapprochait plus de celle du mouton et du porc que de la souris (Boehm et al., 2020; Jones et al., 2017; Slater, 2017). Plus que des différences morphologiques, l'équipe du Professeur Tom Gillingwater (Université d'Édimbourg) a également montré des différences significatives au niveau du profil protéomique des jonctions neuromusculaires murines et humaines (Boehm et al., 2020). Des différences majeures ont été identifiées sur une gamme de voies de signalisation synaptique de base, telles que la « signalisation des intégrines » ou la « signalisation du guidage axonale ». L'ensemble de ces résultats révèlent des différences fondamentales entre la NMJ humaine et les autres espèces de mammifères, différences fondamentales qui doivent être soigneusement prises en considération lors de l'interprétation d'études basées sur des modèles animaux en ce qui concerne leur applicabilité à l'Homme.





**Figure 53 : Hétérogénéité des jonctions neuromusculaires chez les mammifères.** (A) Photos de microscopie confocale représentatives de NMJ de chaque.  $\alpha$ -BTX ( $\alpha$ -bungarotoxine), récepteurs de l'acétylcholine (magenta); vésicule synaptique et neurofilament (vert). Barre d'échelle = 20  $\mu\text{m}$ . (B) Comparaison de la morphologie de NMJ « moyenne » de chaque espèce pour une gamme de variables pré- et post-synaptiques (Boehm et al., 2020).

#### 4.2.2. La jonction neuromusculaire : modèles *in vitro* humains

Au cours de la dernière décennie, une première génération de modèles *in vitro* entièrement humanisés de NMJ a émergé. Initialement, ces protocoles étaient basés principalement sur des motoneurones dérivés de hPSC cultivés avec des cellules musculaires squelettiques primaires humaines (Tableau 13) (Afshar Bakooshi et al., 2019; Marteyn et al., 2011; Santhanam et al., 2018; Shimojo et al., 2015; Steinbeck et al., 2016; Vila et al., 2019). Bien que toutes ces études divergent dans leurs protocoles, elles décrivent toutes la présence de clusters de récepteurs à l'acétylcholine (AChR), ainsi que des contractions musculaires après 2 ou 3 semaines de co-culture. Ces résultats montrent, dans une certaine mesure, la fonctionnalité des cellules musculaires squelettiques primaires humaines lorsqu'elles sont co-cultivées avec des motoneurones humains.

Reference	All from hPSCs	Cell origin	Co-culture duration	2D/3D	Pre-synaptic markers	Synaptic markers	Post-synaptic markers	Muscle contraction	EPP/contractions blocked with drugs	Calcium imaging optogenetics	Disease modeling
Guo et al. (2011)		Human primary myoblasts and hESC-derived MNs	2-3 weeks	2D	IF: SYP and TUBB3	ND	IF: AChRs and MHC	Yes	Yes	ND	ND
Marteyn et al. (2011)		Human primary myoblasts and hESC-derived MNs	2 weeks	2D	IF: TUBB3	ND	IF: AChRs	ND	ND	ND	DM1 (defect in neuritic arborization)
Puttonen et al. (2015)	Yes	hESC mixed differentiation	Up to 6 weeks	2D	IF: SV2, SYP	ND	IF: AChRs, MHC and phalloidin	Yes	Yes	Under stimulation with ACh	ND
Steinbeck et al. (2016)		Human primary myoblasts and hESC-derived MNs	6-8 weeks	2D	IF: SYP	ND	IF: AChRs, desmin and MHC	Yes, after optogenetic stimulation	Yes, after optogenetic stimulation	Chr2	MG (decreased muscle twitches)
Osaki et al. (2018)	Yes	hiPSC-derived muscle cells and hiPSC-derived MNs	2 weeks	3D	IF: ChAT, SMI-32, TUBB3	ND	IF: AChRs, $\alpha$ -actinin	Yes	Yes	Chr2 (CAG promoter, AAV transduction)	ALS (degenerescence, fewer contractions)
Maffioletti et al. (2018)	Yes	hiPSC-derived muscle cells, hiPSC-derived MNs and hiPSC-derived endothelial cells	2 weeks	3D	IF: SMI-32	ND	IF: AChRs, MHC and Titin	ND	ND	ND	Laminopathies Defect in nuclear elongation
Santhanam et al. (2018)		Human primary myoblasts and hiPS-derived MNs	2 weeks	2D microfluidic	IF: NF and SYP	ND	IF: AChRs and MHC	Yes	Yes	ND	ND
Afshar Bakooshli et al. (2019)		Human primary myoblasts and hESC-derived MNs	2 weeks	2D versus 3D	IF: SYP and SMI-32	Laminin $\beta$ 2	IF: AChRs, $\alpha$ -actinin and rapsyn	Yes	ND	GCaMP6/Chr2 (EiFa promoter)	MG (decreased area of muscle response)
Vila et al. (2019)		Human primary myoblasts and Chr2-expressing hiPSC-derived MNs	3 weeks	3D microfluidic	ND	ND	IF: $\alpha$ -actinin	Yes	Yes	Chr2 (EiFa promoter)	MG (difference in contractile properties)
Lin et al. (2019)	Yes	hiPSC-derived muscle cells and hiPSC-derived MNs	Up to 100 days	2D	IF: TUBB3, NF, SV2 and ChAT	ND	IF: AChRs and MHC	No contraction without stimulation	ND	Chr2 (synapsin promoter)	SMA (smaller area of NMJ)
Picchiarelli et al. (2019)	Yes	hiPSC-derived muscle cells and hiPSC-derived MNs	3 weeks	2D	ND	ND	IF: AChRs and $\alpha$ -actinin	ND	ND	ND	ALS (defect in AChR clustering)
Bellmann et al. (2019)	Yes	hiPSC-derived muscle cells and hiPSC-derived MNs	3 weeks	3D microfluidic	IF: TUBB3, ChAT and synapsin EM: vesicles and primary folds	ND	IF: AChRs and $\alpha$ -actinin	No contraction without stimulation	ND	Chr2 (EiFa promoter)	ND
Faustino-Martins et al. (2020)	Yes	hiPSCs and hESCs	Up to 150 days	3D organoids	IF: ChAT, SMI-32, TUBB3, SYP, GFAP, S100 $\beta$ and MBP EM: synaptic cleft and vesicles	IF: laminin sheaths	IF: fast MHC and AChRs EM: sarcomeric units	Spontaneous Blocked by curare	Blocked by TTX	Calcium signal MEA	MG (severe reduction of NMJ)
Kim et al. (2020)		hMPCs and hNSCs	10 days	3D bioprinting	IF: TUBB3, NF and GFAP	ND	IF: MHC AChRs	ND	ND	Calcium signal	Rodent muscle defect injury model
Mazaleyrat et al. (2020)	Yes	Concomitant differentiation of hiPSC-derived muscle cells and hiPSC-derived MNs	30 days up to 7 months	2D	IF: NF and S100 $\beta$	ND	IF: desmin, Pax3/7, titin, MHC and AChRs EM: sarcomeric units and peripheral nuclei	Spontaneous	Blocked by $\alpha$ -BTX and TTX	Calcium signal	DMD, DM1, FSHD2 and LGMD2A (multiple alterations)

$\alpha$ -BTX,  $\alpha$ -bungarotoxin; ACh, acetylcholine; AChR, acetylcholine receptors; ALS, amyotrophic lateral sclerosis; BTX, bungarotoxin; ChAT, choline acetyl transferase; Chr2, channelrhodopsin 2; d-TC, d-tubocurarine; DM1, myotonic dystrophy type 1; EM, electron microscopy; GFAP, glial fibrillary acidic protein; IF, immunofluorescence labeling; hMPCs, human mesenchymal precursor cells; hNSCs, human neural stem cells; hPSCs, human pluripotent stem cells; MBP, myelin basic protein; MG, myasthenia gravis; MHC, myosin heavy chain; ND, no data; NF, neurofilament; SV2, synaptic vesicle type 2; SYP, synaptophysin; TTX, tetrodotoxin; TUBB3,  $\beta$ -III tubulin.

## Tableau 13 : Modèles de NMJ *in vitro* humain (cellules musculaires squelettiques et motoneurones humains) (Barbeau et al., 2020).

### 4.2.3. Modèle de NMJ *in vitro* : prochains challenges

La modélisation *in vitro* de la jonction neuromusculaire humaine est en plein essor avec l'apparition, dès 2011, des premiers modèles utilisant des hPSC (Guo et al., 2011; Marteyn et al., 2011) pour aboutir en 2020, au premier système 3D organoïdes de NMJ humaine (Faustino Martins et al., 2020). La plupart des études de la NMJ humaine ont d'abord utilisé un système de culture cellulaire 2D qui n'imite pas la structure tissulaire native. Récemment, différentes tentatives ont été faites pour évaluer la possibilité de développer un modèle de NMJ humain *in vitro* en profitant de l'avènement des cultures 3D et des technologies microfluidiques sur puce (Afshar Bakooshli et al., 2019; Maffioletti et al., 2018; Osaki et al., 2018; Santhanam et al., 2018; Vila et al., 2019). Santhanam et ses collègues ont été parmi les premiers à appliquer cette technique de microfluidique dans le domaine des NMJ. Les motoneurones et les muscles peuvent ainsi se trouver dans deux chambres différentes reliées par des axones, ce qui permet un contrôle spatio-temporel des cellules. Deux semaines de co-culture ont été suffisantes pour observer des contractions musculaires après stimulation électrique des motoneurones qui peuvent être bloquées par un traitement à la d-tubocurarine. Cependant, le pourcentage de myotubes contractants est inférieur au nombre de NMJ déterminés par immunocytochimie, ce qui suggère une certaine immaturité du système (Santhanam et al., 2018).

Une analyse comparative des co-cultures 2D versus 3D révèle une innervation fonctionnelle plus rapide et plus efficace dans les co-cultures 3D versus 2D. Néanmoins, la petite taille des fibres musculaires, ainsi que les propriétés des potentiels d'action enregistrés dans ces co-cultures par rapport aux modèles mammifères *in vivo*, suggèrent que les co-cultures de NMJ humains 3D ne sont pas complètement matures (Afshar Bakooshli et al., 2019). Récemment, des co-cultures 3D complexes multi-lignées ont été développées contenant des motoneurones, des cellules musculaires squelettiques, ainsi que des neurones sensoriels, des astrocytes, de la microglie et des cellules endothéliales vasculaires, tous dérivés de hiPSC ALS (Pereira et al., 2021). Alors que ces co-cultures complexes étaient principalement caractérisées au niveau morphologique, ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour le développement de plateformes humanisées de type organoïdes pour étudier le développement et la modélisation pathologique de maladie neuromusculaire. Une autre approche, combinant la microfluidique et l'incorporation d'un hydrogel, a permis de générer un modèle de co-cultures 3D entièrement dérivé de hPSC (Osaki et al., 2018; Vila et al., 2019). De telles approches sont compatibles pour étudier et valider le potentiel thérapeutique de composés dans le cadre de troubles neuromusculaires tels que la SLA (Osaki et al., 2018).

Alors que les traitements disponibles pour les troubles neurodégénératifs et musculaires sont rares, il est urgent d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques. Comprendre la physiopathologie des maladies sous-jacentes, telles que l'amyotrophie spinale (SMA est une étape cruciale pour le développement de traitements efficaces. L'utilisation des hPSC et la possibilité de générer des motoneurones et des cellules musculaires porteuses de mutations causales de ces maladies neuromusculaires pourraient permettre l'étude des dérégulations à des stades précoces de l'apparition des phénotypes pathologiques (Thomson et al., 2012). Par conséquent, le défi principal est de générer, à terme, un modèle de NMJ *in vitro* humain et mature comme outil d'évaluation thérapeutique.

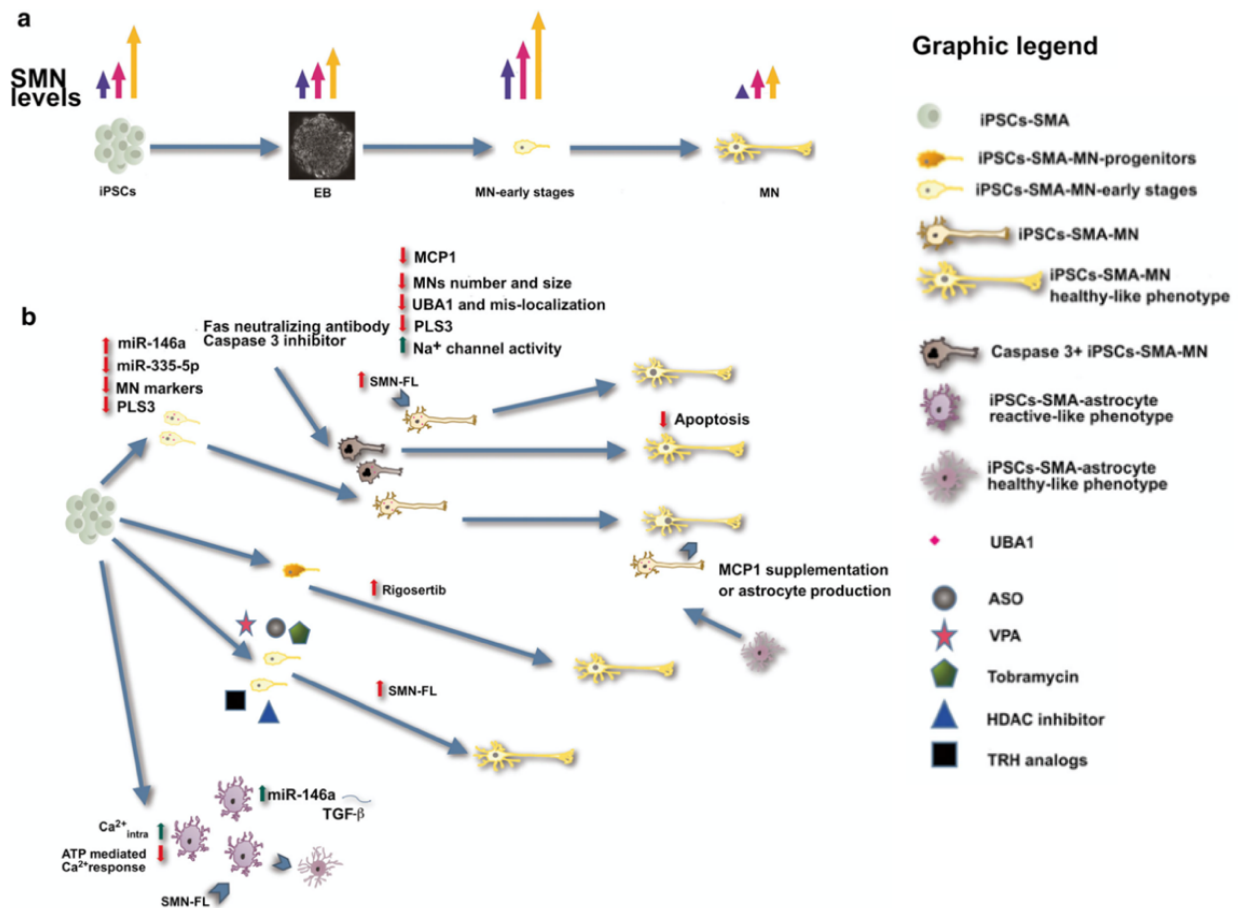
#### 4.3. Modélisation pathologique de l'Amyotrophie Spinale et identification de médicaments candidats *in vitro*

La SMA étant une maladie neuromusculaire, il est primordial d'avoir accès aux différents types cellulaires afin d'y étudier les effets de la mutation, dans des cellules non accessibles chez le patient mais pouvant être produites à partir des hPSC. De plus, le développement de modèles qui reflètent le génotype humain est indispensable. Ainsi, les hPSC dérivés de patients présentent un grand intérêt pour caractériser la physiopathologie cellulaire et moléculaire de cette maladie dans le but de proposer de nouvelles pistes thérapeutiques. Ainsi, en 2009, Ebert et son équipe ont fait la première reprogrammation cellules issues de patient SMA, il s'agissait alors de fibroblastes d'un garçon de 3 ans souffrant de SMA de type I (Ebert et al., 2009). Depuis, des hiPSC ont également été générés à partir de patients SMA de type II, III et IV (Boza-Morán et al., 2015; Heesen et al., 2016; Valetdinova et al., 2019).

#### 4.3.1 *Modèles de motoneurones dérivés d'hiPSC SMA*

Dans les motoneurones générés à partir des hiPSC SMA, le phénotype de mortalité des MN a été retrouvé, il a également été montré que le déficit de croissance des neurites était plus sévère dans les motoneurones spinaux SMA de type I, en corrélation avec la gravité de la maladie (**Figure 54**) (Chang et al., 2011; Ebert et al., 2009; Ohuchi et al., 2016; Son et al., 2019). Bien qu'exprimer de manière ubiquitaire, en quoi la diminution de la protéine SMN entraîne-t-elle la dégénérescence spécifique de ces motoneurones ? Les mécanismes sous-jacents restent incompris. Ainsi, de nombreuses études basées sur l'utilisation de motoneurones dérivés d'hiPSC SMA ont été effectuées et différentes hypothèses ont émergé. La protéine SMN étant un composant essentiel de la machinerie d'épissage, sa diminution entraînerait des dommages à l'ADN dans les motoneurones SMA (Jangi et al., 2017). Le réticulum endoplasmique et la dynamique mitochondriale ont également pu être étudiés et semblent altérés dans ces motoneurones dérivés d'hiPSC SMA (Ando et al., 2017; Ng et al., 2015; Xu et al., 2016). La protéine de liaison à l'actine plastine 3 (PLS3) qui est normalement exprimée dans les cônes de croissance des motoneurones a été identifiée comme significativement réduite dans les motoneurones SMA ce qui augmenterait leur vulnérabilité (Boza-Morán et al., 2015; Heesen et al., 2016). De plus, ces motoneurones présentent une hyperexcitabilité due à une activité accrue des canaux sodiques (Liu et al., 2015), mais ce changement serait spécifique au type I car n'a pas été retrouvé dans les motoneurones dérivés de patient SMA de type III (Lin et al., 2017). Des études ont également rapporté des défauts dans la voie de l'ubiquitine (UBA1) dans la SMA (Fuller et al., 2016; Powis et al., 2016). Plus récemment, des organoïdes spinaux ont été générés à partir de d'hiPSC SMA et ont révélé une activation anormale du cycle cellulaire induite par l'activation de p53 en raison d'un déficit en SMN (Hor et al., 2018). Enfin, des études transcriptomiques ont démontré une déficience en neurexine 2 (NRXN2), une protéine d'adhésion cellulaire présynaptique spécifique aux neurones, une protéine essentielle à la survie et à la fonction des motoneurones (Rizzo et al., 2019).

D'autre part, une fonction altérée de certains miARN et petits ARN non codants (SnRNA) ont été observées dans les motoneurones dérivés de SMA-iPSC (Murdocca et al., 2016; Vazquez-Arango et al., 2016). En effet, une analyse du profil des miARN dans les motoneurones dérivés des hiPSC SMA a démontré une régulation négative de miR-23a, dont la restauration de l'expression pourrait les protéger de la dégénérescence (Kaifer et al., 2019). Une autre étude a également identifié le miARN-146a dont l'inhibition pourrait limiter la dégénérescence des motoneurones (Ohuchi et al., 2016; Sison et al., 2017).



**Figure 54 : Résumé des principales découvertes faite grâce à l'utilisation des hPSC SMA (Adami and Bottai, 2019).**

#### 4.3.2 Modélisation du trouble de la jonction neuromusculaire SMA *in vitro*

L'un des premiers rapports de défauts de NMJ *in vitro* dans la SMA fut émis par l'équipe du Docteur Corti en 2012, dans un modèle hybride de MN dérivés d'iPSC SMA co-cultivés en présence de myoblastes humains sains (Corti et al., 2012). Néanmoins, une perte des MN SMA a été observée sans co-culture avec les cellules musculaires, laissant la possibilité que la mort des MN puisse avoir conduit au défaut de formation de NMJ. En 2015, une équipe a élaboré un modèle hybride inter-espèce utilisant des MN dérivés d'hiPSC SMA et une lignée immortalisée musculaire murine (Yoshida et al., 2015). Les auteurs retrouvent un défaut d'agrégation des récepteurs à l'acétylcholine, potentiellement lié à la mort des MN SMA au cours de la culture. Le test de viabilité a réfuté cette hypothèse puisqu'aucune diminution du nombre de MN n'était détectée, attestant que les défauts de NMJ surviennent avant la mort des MN (Yoshida et al., 2015). Plus récemment, un modèle de NMJ humain SMA, basé sur l'utilisation d'une lignée mutante SMN induite par shRNA, a montré que la diminution de la protéine SMN provoquait la formation de NMJ anormal présentant des défauts fonctionnels concordants avec les défauts observés dans les modèles de souris SMA (Lin et al., 2019).

### 4.3.3 Identification de candidats-médicaments pour la SMA

Plusieurs pistes thérapeutiques ont pu être explorées ou validées en utilisant des motoneurones dérivés d'hiPSC SMA. En effet, des études ont montré que la fonction mitochondriale était compromise dans la SMA et que l'exposition de ces motoneurones à des antioxydants tels que l'édaravone, le lévétiracétam (Ando et al., 2019, 2017) et le N-acétylcystéine (Xu et al., 2016) pouvait inhiber la mort cellulaire induite par le stress oxydatif. D'autre part, l'utilisation d'inhibiteurs de stress du réticulum endoplasmique tels que le Salubrinal ou le Guanabenz permettent d'améliorer la survie des motoneurones (Ng et al., 2015). Divers agents thérapeutiques connus pour atténuer l'apoptose et améliorer la survie cellulaire ont également été étudiés à l'aide d'hiPSC SMA comme : le rigosertib, inhibiteur spécifique de la caspase-3 (Son et al., 2019) ; l'anticorps monoclonal anti-Fas (Sareen et al., 2012) et la surexpression de la neurexine 2, protéine d'adhésion cellulaire présynaptique (Rizzo et al., 2019). Enfin, l'utilisation de systèmes plus complexes, comme le modèle organoïdes spinal 3-D dérivé d'iPSC SMA, a permis de montrer que l'inhibiteur du cycle cellulaire CDK4/6 pouvait préserver les motoneurones de la dégénérescence (Hor et al., 2018). Le modèle de MN dérivés d'hiPSC SMA a également été utilisé à des fins de validation. Le laboratoire Roche a ainsi montré que son composé SMN-C3 (Risdiplam) entraînait l'augmentation des niveaux de protéine SMN dans des MN dérivés d'hiPSC SMA (Naryshkin et al., 2014).

D'autre part, des molécules thérapeutiques qui visent à corriger les défauts de NMJ de la SMA ont pu être identifiées. En effet, l'acide valproïque (VPA) et des oligonucléotides anti-sens (ASO) permettraient de rétablir les défauts de la jonction neuromusculaire, comme le nombre de clusters d'AChR (Lin et al., 2019; Yoshida et al., 2015).

A l'heure actuelle, les publications décrivant les modèles *in vitro* de NMJ pour l'étude de la SMA se concentrent principalement sur l'évaluation de leur pertinence physiologique et sur la validation d'un système qui récapitule *in vitro* des phénotypes déjà connus de maladie. Et finalement que très peu d'études ont procédé à identification de nouveaux phénotypes pathologiques. De plus, la quasi-totalité des criblages de composés pour la SMA a été réalisée dans des modèles peu relevant pour la maladie. La perspective est désormais d'utiliser des systèmes entièrement dérivés de hPSC sous la forme de plateforme adaptée au criblage, ce qui permettrait de reproduire *in vitro* le génotype d'un patient atteint de la SMA ou autre maladie neuromusculaire afin de procéder à des criblages de molécules thérapeutiques en plus de la modélisation pathologique.

# TRAVAUX DE RECHERCHE

---

## PROBLEMATIQUE & DEMARCHES EXPERIMENTALES

---

La SMA, bien que longtemps caractérisée comme une maladie du motoneurone, présente des défauts au niveau de la jonction neuromusculaire (NMJ). En effet, des études basées sur différents modèles de SMA en sont arrivées à la même conclusion : les défauts observés au niveau de la NMJ apparaissent de manière pré-symptomatique, avec une dénervation évidente dans certains muscles, et ce avant même la perte de motoneurones. Toutefois, pour des raisons encore inconnues, certains sous-types de motoneurones ainsi que leur NMJ présentent des degrés variables de susceptibilité à la dégénérescence. La grande majorité de ces résultats reposent sur l'utilisation de modèle animaux de SMA et plus particulièrement des modèles murins SMA dont la transposition chez l'Homme est sujet à discussion.

En s'appuyant sur la technologie des cellules souches pluripotentes humaines, l'objectif de ma thèse était d'une part d'évaluer, *in vitro*, la sensibilité différentielle des motoneurones dans la SMA, dans le but d'identifier de nouveaux mécanismes moléculaires et cellulaires associés à la dégénérescence spécifique des motoneurones spinaux. En se basant sur un protocole développé précédemment dans l'équipe (Maury et al., 2015), notre démarche expérimentale fut de générer les cellules d'intérêt, à savoir les motoneurones spinaux et craniaux à partir des hiPSC de patients SMA et contrôle. D'autre part, l'objectif était d'évaluer les conséquences fonctionnelles de ces défauts en termes de connectivité avec leur cible musculaire squelettique. Ce programme a été développé en collaboration avec une étudiante en thèse de l'équipe, Julie Tahraoui, dont le travail portait sur le développement d'un système de co-culture humain, dans le cadre de la Dystrophie Myotonique de type 1 (DM1). Notre objectif était double, développer un modèle *in vitro* humain de la jonction neuromusculaire à des fins de modélisation pathologique et adapté à la validation de pistes thérapeutiques potentielles pour les maladies neuromusculaires.

D'autre part, malgré les résultats remarquables que proposent les trois approches thérapeutiques actuelles de la SMA, différentes études soulignent la nécessité de développer des stratégies thérapeutiques supplémentaires pour fournir des soins optimaux à tous les patients atteints de SMA. Dans ce sens et sur la base des différents phénotypes observés dans nos modèles dérivés d'hiPSC SMA, le dernier objectif de ma thèse était d'évaluer la faisabilité de ce nouveau modèle humain *in vitro* de co-culture SMA pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques SMN-dépendantes ou SMN-indépendantes. Ainsi, en nous inspirant d'études réalisées dans un autre contexte de maladie neuromusculaire, la sclérose latérale amyotrophique (SLA), une petite molécule inhibitrice de plusieurs voies de signalisations : CDKs (cyclin-dependent kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinase) et GSK3 (Glycogen Synthase Kinase-3), la kenpaullone, avait été identifiée comme capable de prévenir la mort des motoneurones (Yang et al., 2013). Dans ce contexte, nous avons évalué l'effet de cette famille chimique dans nos modèle dérivés d'hiPSC SMA. En parallèle de ce travail et sur la base de



résultats prometteurs obtenus, par l'équipe du Pr. Ruben Artero (Université de Valence, Espagne), après criblage de composés repositionnable pour leur capacité à induire l'expression de la protéine SMN, une collaboration s'est formée avec cette équipe et l'équipe du Dr. Marina Boido (Université de Turin, Italie) (Konieczny and Artero, 2020). L'objectif de cette collaboration était d'identifier et de valider le meilleur candidat grâce à l'utilisation de différents modèles : *in vitro* humain SMA (fibroblastes, cellules musculaires, motoneurones dérivés d'hiPSC, co-culture de motoneurones et cellules musculaires), et dans un modèle *in vivo* de souris SMA.

L'ensemble de ces travaux ont ainsi permis d'ouvrir de nouvelles pistes d'études, basés sur des modèles *in vitro* humain, telles que la sensibilité différentielle des sous-types de motoneurones associés à des défauts de la jonction neuromusculaire dans la SMA, et l'identification de nouvelles pistes thérapeutiques SMN-dépendantes ou SMN-indépendantes.

### Article 1

#### **Inhibition of JNK and GSK3 signaling pathway promotes spinal motor neurons survival and muscle improvement in human *in vitro* SMA co-culture system**

Camille Januel<sup>1</sup>, Julie Tahraoui-Bories<sup>1</sup>, Julien Côme<sup>1</sup>, Léa Lesueur<sup>2</sup>, Lise Morizur<sup>2</sup>, Céline Le-teur<sup>2</sup>, Jérôme Polentes<sup>2</sup>, Vincent Mouly<sup>3</sup>, Laurent Schaeffer<sup>4</sup>, Marc Peschanski<sup>2</sup>, Cécile Martinat<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSERM / UEPS UMR 861, Université Paris Saclay, I-STEM, 91100 Corbeil-Essonnes, France.

<sup>2</sup> CECS/AFM, I-STEM, 91100 Corbeil-Essonnes, France.

<sup>3</sup> Sorbonne Université, INSERM, Association Institut de Myologie, Centre de recherche en myologie, UMR-S 974, Paris, France.

<sup>4</sup> Université de Paris, CNRS, SPINN – Saint-Pères Paris Institute for the Neurosciences, Paris, France.

Depuis ces dix dernières années, le domaine de la SMA a énormément évolué avec l'émergence de nouvelles stratégies thérapeutiques, et le développement de trois médicaments aujourd'hui mis sur le marché. Bien qu'utilisant des stratégies différentes, ces traitements visent tous à augmenter le niveau de la protéine SMN, soit en ciblant l'épissage du gène *SMN2* (Hua et al. 2010; Naryshkin et al. 2014; Feng et al. 2016); soit par thérapie génique, en délivrant le gène *SMN1* (Foust et al. 2010; Valori et al. 2010). Compte tenu de certaines limitations soulignées dans différents rapports, la nécessité d'identifier de nouvelles stratégies, SNC et SMN-indépendantes sont toujours présentes, dans le but de fournir des soins optimaux à tous les patients atteints de SMA (Kruzik et al. 2019; Van Alstyne et al. 2021; Al-Zaidy and Mendell 2019; Ravi et al. 2021). D'autre part, connaissant l'extrême difficulté d'accéder aux cellules d'intérêt chez les patients SMA, le développement de nouveaux modèles cellulaires SMA humanisés appropriés sont indispensables afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pertinentes.

Dans ce contexte, cette publication répond aux objectifs suivants : (i) développer un modèle de motoneurones dérivés de hiPSC à large échelle adapté à la modélisation pathologique et à l'identification de cibles thérapeutiques ; (ii) étudier la communication entre le motoneurone avec sa cible musculaire squelettique dans le contexte SMA ; (iii) valider ces cibles thérapeutiques potentielles en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques.

## I. **Modèle de motoneurones dérivés de hiPSC adapté à la modélisation pathologique SMA et à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques**

### 1. Génération de motoneurones dérivés de hiPSC à grande échelle et modélisation pathologique de la SMA

La première étape de ce projet a été de générer des motoneurones spinaux porteurs de mutation SMA et contrôle. Pour cela, j'ai eu à ma disposition 3 lignées de hiPSC SMA et contrôle provenant de familles différentes. De plus, grâce à un travail effectué dans l'équipe avant mon arrivée, un contrôle isogénique a été généré à partir d'une lignée SMA dans lequel un plasmide codant pour SMN a été transfecté de manière stable (lignée nommée « Rescue »). La différenciation en motoneurones spinaux de ces hiPSC a été faite selon le protocole développé précédemment par l'équipe (Maury et al. 2015), protocole que j'ai adapté en bioréacteurs afin de générer des grandes banques de motoneurones spinaux à partir d'hiPSC. Cette première étape a permis de démontrer que la diminution de la protéine SMN, n'altère pas la génération de motoneurones spinaux après 14 jours de différenciation et la quantification par les marqueurs ISL1/HB9 montre un taux d'efficacité d'environ 70%. Dans un second temps, nous avons évalué la survie de ces motoneurones à différents de temps : 18 et 24 jours de différenciation, et avons montré une diminution significative de la survie des motoneurones SMA à partir du jour 24 par rapport aux conditions contrôle et rescue. Ces résultats ont démontré que ce modèle de motoneurones dérivés de hiPSC SMA reproduisait les principales caractéristiques de la maladie où la mort des motoneurones spinaux est directement corrélée au faible niveau d'expression de la protéine SMN.

### 2. Identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour la SMA

En nous inspirant de la littérature, une petite molécule, la kenpaullone, a été identifiée comme capable de prévenir la mort des motoneurones dans un autre contexte de maladie du motoneurone, la sclérose latérale amyotrophique (SLA) (Yang et al. 2013). Ce composé est connu pour son effet inhibiteur de plusieurs voies de signalisations : CDKs (cyclin-dependent kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinase) et GSK-3 (Glycogen Synthase Kinase-3) (Leost et al. 2000; Meijer et al. 2004; Y. M. Yang et al. 2013). Dans le but d'évaluer l'effet de la kenpaullone dans notre modèle *in vitro* SMA, les motoneurones ont été exposés à différentes doses de kenpaullone à partir du 14<sup>ème</sup> jour de différenciation et pendant les 10 jours suivants. De façon intéressante, nous avons constaté une augmentation significative de la survie des motoneurones SMA après traitement à la kenpaullone (10  $\mu$ M). Différentes études, basées sur des modèles de souris SMA, ont démontré que la dégénérescence des motoneurones se produisait par un mécanisme apoptotique (Sareen et al. 2012; Simon et al. 2017; Schellino et al. 2018). Processus apoptotique que nous avons aussi identifié comme spécifiquement activé dans les motoneurones SMA, et ce même avant le phénomène de mort cellulaire, comme nous l'a montré l'augmentation significative du marquage *Cleaved-Caspase-3* dès le 18<sup>ème</sup> jour

de différenciation par rapport aux conditions contrôle et rescue. Ainsi, ces résultats suggèrent que le phénomène de mort prématuré des motoneurones SMA observé pourrait être médié par un processus apoptotique, processus apoptotique restauré par le traitement à la kenpaullone.

Dans le but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, nous avons cherché à déterminer par quelle(s) mécanisme(s) la kenpaullone pouvait agir sur la survie des motoneurones SMA. La kenpaullone est rapportée comme un inhibiteur des voies CDKs, GSK-3 et JNK. Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet d'autres inhibiteurs spécifiques des CDKs, à savoir la roscovitine et l'olomoucine, qui n'ont montré aucun effet sur la survie des motoneurones SMA. Ensuite, la voie JNK se trouve en amont de la voie de l'apoptose neuronale médiée par la phosphorylation de la protéine c-Jun (Yarza et al. 2015). De façon intéressante, nous avons observé une corrélation entre le marqueur phospho-c-Jun et la mort prématurée des motoneurones SMA, restaurée par le traitement à la kenpaullone. Enfin, bien que la kenpaullone soit défini comme un inhibiteur de la forme GSK-3 $\beta$ , l'analyse après traitement des motoneurones a montré une diminution des deux isoformes GSK-3 $\alpha$  et  $\beta$  dans les motoneurones contrôles et SMA. D'autre part, sachant que la mort prématurée des motoneurones SMA corrèle avec le faible niveau de protéine SMN, la kenpaullone pourrait agir en augmentant les niveaux de la protéine SMN dans les motoneurones SMA. Cependant, nous ne mesurons aucune variation des niveaux de SMN après traitement à la kenpaullone, que ce soit au niveau ARN ou protéique. Nous pouvons ainsi conclure que l'effet protecteur de la kenpaullone observé dans les motoneurones dérivés de hiPSC SMA semble médié par l'inhibition des voies de signalisation JNK et GSK-3. Ces données suggèrent que de faibles niveaux de SMN pourraient conduire à une activation de la voie du stress intracellulaire dans les motoneurones, initiant la neurodégénérescence (Genabai et al. 2015; Schellino et al. 2018; Burghes and Beattie 2009). Pour valider l'effet protecteur de l'inhibition des voies de signalisation JNK et GSK-3 dans les motoneurones SMA, nous avons évalué et confirmé l'effet d'autres inhibiteurs plus spécifiques des voies JNK et GSK-3, dont le Tideglusib, un inhibiteur GSK-3 $\beta$  qui a montré des propriétés neuroprotectrices, anti-inflammatoires et neurogènes dans différents modèles neurodégénératifs (Morales-Garcia et al. 2012; Martínez-González et al. 2021). Ce composé est aujourd'hui en essai clinique de phase III pour la DM1 (NCT03692312) et un essai clinique de phase II a été lancé très récemment pour la SLA (NCT05105958).

## **II. Modèle *in vitro* humain de co-culture SMA pour étudier la communication entre le motoneurone et sa cible musculaire**

### **1. Altérations de la communication entre les motoneurones et la cible musculaire dans un contexte SMA**

Dans le but d'étudier l'effet de la diminution de la protéine SMN de façon plus fonctionnelle au niveau des motoneurones, nous avons développé un modèle de co-culture

permettant d'étudier leur communication avec la cellule musculaire squelettique. Ce modèle a été développé grâce à une collaboration entre I-STEM et la société CYTOO, une entreprise à l'origine de la technologie *MyoScreen*, permettant d'améliorer la maturité des cellules musculaires *in vitro* grâce à la présence d'environ 50 patterns en forme d'ovni dans chaque puits de plaque 384 puits (Young et al. 2018). Le protocole est divisé en trois phases : ensemencement et prolifération des myoblastes primaires pendant 2 jours, différenciation et fusion des myoblastes en myotubes pendant 2 jours, puis ajout des motoneurones (J14) et établissement de communication entre les motoneurones et la cellule musculaire pendant 4 à 7 jours (Tahraoui et al., 2022). Dans ce système, différentes combinaisons sont possibles : l'utilisation d'un modèle purement SMA ou contrôle, mais le modèle peut aussi être hybride, dans le but d'étudier la contribution de la composante motoneuronale SMA d'une part et musculaire SMA d'autre part.

Dans un premier temps, après une semaine de co-culture nous avons reproduit le défaut de survie des motoneurones SMA, correspondant au 21<sup>ème</sup> jour de différenciation, à partir des hiPSC SMA, et ce en présence de myotubes SMA ou contrôle. Comme déjà démontré dans des modèles murins SMA, l'aire de fusion des cellules musculaires primaires et immortalisées SMA est retrouvée significativement diminuée par rapport aux myotubes WT et ce même avant la mort des motoneurones SMA. Ainsi, la diminution de la protéine SMN a un impact sur la myogenèse qui ne semble pas être dépendante de la présence des motoneurones (Monani et al. 2000a; Hellbach et al. 2018).

Afin d'évaluer si les motoneurones SMA présentaient des défauts fonctionnels, nous avons évalué différents paramètres dans nos modèles de co-culture en se plaçant à des temps plus précoces, correspondant à des motoneurones J18. De façon intéressante, la diminution de la protéine SMN au niveau des motoneurones aboutie à une diminution anormale de l'arborisation neuritique. Afin de mieux comprendre les conséquences de ce phénotype sur la physiologie du compartiment post-synaptique, nous nous sommes concentrés sur deux processus majeurs de la transmission neuromusculaire à savoir les clusters de récepteurs à l'acétylcholine (AChR) et l'activité calcique dans les cellules musculaires. La quantification des clusters d'AChR a été réalisée par une technique d'immunofluorescence et d'analyses semi-automatisées permettant de mesurer la surface des clusters d'AChR. La présence de motoneurones SMA sur des cellules musculaires contrôle montre une diminution de ces clusters, diminution encore plus importante lors que co-cultivés sur des myotubes SMA. Ces résultats suggèrent une altération de la voie d'induction du clustering des AChR, qui pourrait provenir à la fois de la composante motoneuronale et musculaire dans la SMA. Ces défauts pourraient ainsi affecter la qualité de la communication entre le motoneurone et la cellule musculaire. Pour évaluer la transmission entre les deux types cellulaires, nous avons étudié l'activité calcique dans les myotubes. Dans les conditions de co-cultures en présence de cellules musculaires SMA, le défaut de maturation est tel qu'aucune activité calcique n'est mesurable. Cependant, les analyses des autres conditions contrôle ou hybrides ont montré qu'en présence de motoneurones SMA, le nombre de pics calciques était significativement diminué, phénotype normalisé par la restauration de la protéine SMN dans la condition

rescue. Ces défauts suggèrent une dérégulation de la communication entre les motoneurones mutés SMA et les cellules musculaires saines ; défauts qui semblent exacerbés par la présence de cellules musculaires SMA. Nous pouvons conclure, grâce à ces outils cellulaires, que les deux compartiments pré- et post-synaptique contribuent à la mise en place des défauts de NMJ observés dans la SMA.

## 2. Validation des nouvelles cibles thérapeutiques identifiées dans ce modèle de co-culture SMA

L'altération de la NMJ se produit avant la mort des motoneurones dans la SMA, et serait même l'un des premiers, voir le premier signe pathologique de la maladie. Ainsi, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques capables de restaurer ces défauts pourrait être une approche efficace. Le format 384 puits du modèle de co-culture offre la possibilité de tester un grand nombre de conditions. Par conséquent, nous avons évalué dans notre modèle de co-culture entièrement composé de cellules SMA ou contrôle, l'effet de la kenpaullone et des différents inhibiteurs spécifiques de la voie JNK ou GSK-3 identifiés précédemment.

L'utilisation de la kenpaullone et des inhibiteurs spécifiques des voies JNK ou GSK-3 dans le modèle de co-culture SMA confirme l'effet protecteur de ces composés pour la survie des motoneurones. De même, l'aire des myotubes SMA est retrouvée significativement augmentée après traitements par un inhibiteur de la voie JNK ou GSK-3. De façon très intéressante, les défauts pré- et post-synaptiques observés avant même la mort des motoneurones SMA sont, au moins partiellement, restaurés par l'inhibition des voies JNK ou GSK-3. Ainsi, ces résultats confirment l'effet protecteur de l'inhibition de ces voies et montre ainsi la pertinence de ces voies dans la pathogénèse de la SMA.

Pour conclure, nous avons développé un système de co-culture SMA humanisé permettant d'évaluer la communication entre le motoneurone et sa cible musculaire. Nous avons également démontré le potentiel de ces modèles à des fins d'identification ou de validation de composés thérapeutiques. Dans ce contexte, nous avons démontré que l'inhibition des voies de signalisation JNK ou GSK-3 pouvait être de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour la SMA. Plus généralement, ces systèmes pourraient également être utiles pour d'autres troubles neuromusculaires.

# **Inhibition of JNK and GSK3 signaling pathway promotes spinal motor neurons survival and muscle improvement in human *in vitro* SMA co-culture system**

Camille Januel<sup>1</sup>, Julie Tahraoui-Bories<sup>1</sup>, Julien Côme<sup>1</sup>, Léa Lesueur<sup>2</sup>, Lise Morizur<sup>2</sup>, Céline Leteur<sup>2</sup>, Jérôme Polentes<sup>2</sup>, Vincent Mouly<sup>3</sup>, Laurent Schaeffer<sup>4</sup>, Claire Legay<sup>5</sup>, Marc Peschanski<sup>2</sup>, Cécile Martinat<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSERM / UEPS UMR 861, Université Paris Saclay, I-STEM, 91100 Corbeil-Essonnes, France.

<sup>2</sup> CECS/AFM, I-STEM, 91100 Corbeil-Essonnes, France.

<sup>3</sup> Sorbonne Université, INSERM, Association Institut de Myologie, Centre de recherche en myologie, UMR-S 974, Paris, France.

<sup>4</sup> Université de Paris, CNRS, SPINN – Saint-Pères Paris Institute for the Neurosciences, Paris, France.

<sup>5</sup> INMG, Inserm U1217, CNRS UMR5310, Université Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France.

\* Corresponding author: C. Martinat, PhD, I-Stem, 28 rue Henri Desbruères 91100 Corbeil-Essonnes France, Tel: + 00 33 1 69 90 85 33, Fax: + 00 33 1 69 90 85 21, E-mail: cmartinat@istem.fr

## **ABSTRACT**

Spinal muscular atrophy is one of the most common genetic forms of motoneuron diseases in childhood. Due to mutations in the SMN1 gene, SMA is characterized by an insufficient amount of SMN (survival motor neuron) protein, resulting in denervation, skeletal muscle atrophy and death. In the last decade, three treatments increasing SMN protein levels have been approved by the US Food and Drug Administration and result in impressive benefits for the patients. However, an intervention delay has a strong negative impact on the efficacy, especially when therapy starts at a late symptomatic stage. Even when therapy starts at pre-symptomatic stages, not all SMA patients respond equally well and symptoms progress. An important step forward would be to develop therapeutic approaches targeting pathways that are independent of SMN. However, predictive and functional SMA *in vitro* models for drug screening are still lacking. In this context, we developed a human SMA *in vitro* co-culture system between pluripotent stem cells-derived spinal motoneurons and their muscular targets adaptable to screening format in 384 well plates. These inter-cellular systems reproduced the specific death of SMA spinal motoneurons but also the pre-synaptic defects that appeared before this specific cell death. To evaluate the suitability of these intercellular systems for drug screening, we developed a target-agnostic based drug screening revealing the potential of JNK3 and GSK3 inhibitors to normalize the cellular phenotypes associated to SMA independently of SMN expression.

**Keywords:** Spinal Muscular Atrophy, Human induced pluripotent stem cells, Motoneurons, Co-culture.

## INTRODUCTION

Spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive disorder characterized by the selective degeneration of lower  $\alpha$ -motor neurons in the anterior horn of spinal cord, resulting in denervation, skeletal muscle atrophy and in severe cases respiratory failure and death (Prior et al., 2009; Wirth et al., 2006). SMA etiology relates to an insufficient amount of survival motor neuron (SMN) protein which, results from loss-of-function mutations or deletion of the *SMN1* (Lefebvre et al., 1995; Rodrigues et al., 1995). While a total deficiency in the SMN protein is embryonic lethal (Schrank et al., 1997), humans have a duplicated copy of *SMN1*, termed *SMN2* (Lefebvre et al., 1995; Rochette et al., 2001), which allows for survival in the absence of the former. However, the duplicated *SMN2* gene cannot fully compensate for the loss of *SMN1* because it predominantly gives rise to an exon 7- skipped SMN2 mRNA that produces a non-functional truncated SMN $\Delta$ 7 protein (Lorson et al., 1999; Monani et al., 1999). Thus, the *SMN1* copy gives rise to the full-length (FL) SMN protein while approximately 10% of FL-SMN transcripts are produced by the *SMN2* copy. This level is insufficient to support long-term motor neurons survival. Importantly, the severity of the disease is inversely correlated with SMN protein levels.

Therapeutic strategies have recently emerged and have started to change the field of SMA with the development of three FDA-approved commercial drugs. All of them are based on genetic modulations that aim to increase SMN level, either by targeting *SMN2* to produce more full-length SMN or by delivering a fully functional SMN gene into patients' motor neurons to supplement their own production of the protein. These strategies include antisense oligonucleotide (ASO) (Hua et al. 2010; Porensky et al. 2012; Zhou et al. 2013; Passini et al. 2011), adeno-associated virus (AAV) for introducing *SMN1* gene (Foust et al., 2010; Valori et al., 2010) and small molecule (Naryshkin et al., 2014). While the benefits of these SMN-dependent therapies are undeniably remarkable, some concerns may still be raised. First, disease duration before treatment is critical and a delayed intervention leads to a less efficient rescue (Ravi et al., 2021). In addition, treated SMA patients can still display neuromuscular symptoms and decline, and for reasons still unknown, patients respond differently to the treatment, roughly dividing into groups of responders that improve, responders that plateau and non-responders (Aragon-Gawinska et al., 2018; Gidaro and Servais, 2019; Kruzik et al., 2019; Pechmann et al., 2018). Finally, the high costs of the approved new treatments as well as the limited data on long-term efficacy also highlight the importance to identify new therapeutic strategies which are not based on enhanced SMN protein expression but reverse pathological changes independent of SMN (Bowerman et al., 2017; Gidaro and Servais, 2019; Lipnick et al., 2019; Ravi et al., 2021).

However, identification of such SMN independent strategies needs to rely on robust models capable to recapitulate pathological changes. Recent advances in stem cell biology have fueled the prospect to establish a more relevant human cellular model for SMA disease (Makarev et al., 2015; Schmid and DiDonato, 2007).

Based on our previous protocol to efficiently produce spinal motor neurons (MNs) from human pluripotent stem cells, we developed in this study target agnostic-based drug screening



systems in order to identify therapeutic strategies capable to reverse pathological changes observed in MNs independently of SMN expression.

## RESULTS

### Large-scale generation of hiPSC-derived spinal motor neurons

Although the generation of mature spinal motor neurons (MNs) from hiPSC has been proven successful, these systems do not allow the generation of hiPSC-derived cells in relevant quantities for drug screening applications (Ando et al., 2017; Wang et al., 2019). Consequently, we sought to adapt our previously reported protocol by using bioreactor scale-up in order to produce large scale production of hiPSC-derived spinal MN (Maury et al. 2015). Briefly, this protocol is a three-stage process that involves neural induction through the generation of embryoid bodies (EBs) (day 0-10), conversion of MN progenitors (day 10-14) and final maturation (day 14-24) (**Figure 1A**). After 10 days of differentiation, EBs dissociated from the bioreactors showed a 20-time increased in cell yield compared to T25 flasks with around  $300 \times 10^6$  cells per bioreactor. EBs cultivated in bioreactors sustained their morphology during the entire process (**Figure 1B**) and generated spinal MN progenitors of typical morphology after adherence to culture plates and OLIG2 marker profile (**Figure 1C,D**). In addition, at this time, MN progenitors can be frozen, allowing the possibility to generate large cell banks. Independently of the use of T25 flasks or bioreactors, we observed after 14 days of differentiation a highly pure spinal MN culture as revealed by the expression of MN specific transcription factors LIM homeodomain transcription factor (ISL1–70%) and Homeobox protein (HB9–70%) (**Figure 1C,E,F**). After 24 days of differentiation, most of these HB9/ISL1-positive MNs expressed the pan-neuronal marker Tuj1 and choline acetyltransferase (ChAT) (**Figure 1C**). These results demonstrated our ability to generate large bank of hiPSC-derived MNs.

### SMA hiPSC-derived MNs have increased susceptibility to MN death

Healthy and SMA type I patient's fibroblasts-derived hiPSC were differentiated into spinal MNs according to this protocol. In addition, an SMA hiPSC line has been modified to stably expressed SMN (Rescue). The hiPSC lines were efficiently differentiated into OLIG2 positive spinal MN progenitors (**Figure 2A,B**) as well as their efficient conversion into spinal MNs (70% of MNs) characterized by the expression of the ISL1 marker on day 14 (**Figure 2A,C**). These results demonstrated that the reduced level of SMN expression does not impair the temporal and differentiation into MN generation.

Next, we assessed the survival of hiPSC-derived MNs by counting ISL1 positive cells from day 14 to day 24 (**Figure 2D**). At day 24, a significant decrease in MN survival was observed in the SMA culture compared to the control and rescue MNs. We next quantified the SMN protein level in these MNs from SMA patient lines compared to the wild-type and rescue lines by western blotting (**Figure 2E**). Our results confirmed a lower expression of SMN protein in SMA hiPSC-derived MNs compared to the wild-type and rescue lines (**Figure 2F**). Different studies in SMA mouse models have demonstrated that the selective degeneration of MNs in SMA occurs through an apoptotic mechanism (Sareen et al., 2012; Schellino et al., 2018; Simon

et al., 2017). To investigate whether the MNs carrying pathogenic mutations on *SMN1* gene develop an apoptotic process under normal culture conditions, we assessed markers of cellular stress and cell death such as cleaved caspase-3 in MNs derived from control, SMA patients and rescue lines (**Figure 3D,E**). At day 14, when there is no difference on MN survival, the immunostaining of cleaved-caspase-3 showed a little increase trend (10%) of apoptotic MNs in SMA patients, compared to control and rescue MNs. From d18 and d24 the cleaved-caspase-3 signal is significantly increased in the SMA spinal MN compared to control and rescue ones. Altogether, these results confirmed the capacity of SMA hiPSC- derived MNs to reproduce key pathological changes.

### **Kenpaullone promotes the survival of SMA hiPSC-derived MNs**

A previous study identified the capacity of a chemical compound, kenpaullone, to restore MN cell death observed *in vitro* in the context of another neuromuscular disease, the amyotrophy lateral sclerosis (ALS) (Yang et al. 2013). To examine the potential efficacy of kenpaullone as a MN protective agent in SMA, we exposed both SMA or control hiPSC-derived spinal MNs to kenpaullone at different concentrations from 1.25 to 20  $\mu$ M from day 14 of differentiation and for the next 10 days with each medium change every two days (Figure 3A). By measuring the number of ISL1 positive cells, we observed that kenpaullone treatment, at 10  $\mu$ M, resulted in a significant increased survival of MNs derived from SMA hiPSC (**Figure 3B,C**). We also evaluated by immunostaining the expression of cleaved caspase-3 in MNs after kenpaullone treatment and observed a significant decrease (about 50%) in apoptotic signal in SMA MNs (**Figure 3D,E**), suggesting that kenpaullone can exert an anti-apoptotic role in MNs. In order to evaluate the hypothesis that kenpaullone could act on the survival of SMA hiPSC-derived MNs by increasing SMN expression, we quantified the relative mRNA (**Figure S1A**) and protein expression (**Figure S1B-C**) levels of SMN on treated and untreated control and SMA MNs. No effect of kenpaullone was observed on SMN expression suggesting that the mode of action of this compound is SMN-independent.

### **Kenpaullone acts as JNK and GSK3 inhibitor pathways in hiPSC-derived MNs**

The mode of action of kenpaullone has been previously shown to rely on three distinct pathways: inhibition of several cyclin dependent kinases (CDKs), glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) (Castelo-Branco et al. 2004; Akiba et al. 2016). We sought to evaluate the potential contribution of each of these pathways on the survival of SMA hiPSC-derived MNs. First, we evaluated the implication of CDK signaling pathways by testing other specific CDKs inhibitors, roscovitine and olomoucine, for their ability to decreased MN cell death (**Figure 4A**). No effect on the survival of hiPSC-derived MNs was observed after treatment with these two compounds, indicating that the kenpaullone-mediated survival effect is independent of CDKs inhibition. As kenpaullone has also been reported to induce an inhibition of JNK pathway, a kinase upstream in the phospho-c-jun mediated neuronal apoptosis pathway, we determined the number of MNs expressing phospho-c-jun before treatment, at day 14, day 18, and after 10 days of treatment (**Figure 4B,C**). We observed a significant increased number of SMA MNs positive for phospho-c-Jun from day 18 to day 24 compared to WT and rescue MNs. Our results also demonstrated the capacity of kenpaullone treatment to reduce the number of phospho-c-Jun positive MNs. Finally, we also evaluated by western blot

the expression of GSK3 after kenpaullone treatment. These analysis showed marked decrease in GSK-3 $\beta$  and GSK-3 $\alpha$  after Kenpaullone treatment on both control and SMA MNs (**Figure 4D,E**). Our data suggest that the protective effect of kenpaullone observed in MNs derived from SMA hiPSC is mediated by the inhibition of JNK and GSK3 signaling pathways. Our data suggest that the protective effect of kenpaullone observed in MNs derived from SMA hiPSC is mediated by the inhibition of JNK and GSK3 signaling pathways.

To validate the protective effect of the JNK and GSK3 signaling pathway inhibition in SMA MNs, we evaluated different specific JNK and GSK3 inhibitors (**Table S2**). We observed that treatment with all these JNK and GSK3 inhibitor compounds led to an increased survival of MNs derived from SMA hiPSC (**Figure 5A-E**, **Figure S2A-F**). These findings suggest that JNK and GSK3 inhibition could be a potential target to reduce neurodegeneration in SMA.

### **Human *in vitro* SMA co-culture system to study the communication defects between human skeletal muscle cells and hiPSC-derived MNs**

Even though SMA is classically categorized as a motor neuron disease, there is a general consensus that pathological changes of the neuromuscular junction precede the motor neuron loss (Ling et al. 2012; Murray et al. 2008; 2015; Kariya et al. 2008). We consequently evaluated the possibility to reproduce *in vitro* these changes at the neuromuscular junction. For this purpose, we based our approach on our recent development of co-cultures of hiPSC-derived MNs and human skeletal muscle cells using micropatterned 384 plates shown to favor the formation of aligned and striated mature myofibers from human primary skeletal muscle cells (**Figure 6A**) (Young et al. 2018; Tahraoui et al., 2022 - submitted).

We first characterized our co-culture system one week after MN seeding, corresponding to MN day 21. As expected, a significant decrease of SMA hiPSC-derived MNs survival was observed after co-culture with WT or SMA skeletal muscle cells (**Figure 6B,C**). Strikingly, we observed a significantly reduced fusion capacity of SMA skeletal muscle cells when compared to control cells (**Figure 6B,D** and **Figure S3A-F**). This result was also observed with immortalized skeletal muscle cells from SMA type I or type II patients compared to WT (**Figure S4A-D**).

A key characteristic of myotubes and muscle fibers is the ability to connect with motoneurons via neuromuscular endplates. We characterized our *in vitro* co-culture system and found that AchRs were clustered at the site of SV2-positive neuronal endplates (**Figure 7A**) and synaptophysin-positive neuronal endplates (**Figure 7B**). In addition, the AchR clusters were localized on MF20-positive multinuclear myotubes (**Figure 7C**). Defective pre- and post-synaptic defects were observed before the death of hiPSC-derived MNs. Decreased neuritic length was specifically observed with SMA hiPSC-derived MNs when compared with SMA Rescue or WT hiPSC-derived MNs (**Figure 7D**). Consequently, decreased AChR clustering was also observed at the post-synaptic level in SMA conditions (**Figure 7E**). SMA hiPSC-derived MNs induced statistically less AchR clusters area in SMA or WT myotubes than control and rescue hiPSC-derived MN. To evaluate the consequences of these phenotypes in term of functional connectivity between MN endplates and muscle fibers, we analyzed the Ca<sup>2+</sup> oscillations induced by hiPSC-derived MNs at the level of skeletal muscle cells (**Figure 7F-G**). A significant decrease in the frequency of calcium waves was observed in control skeletal muscle cells when co-cultured in presence of SMA hiPSC-derived MNs compared to control hiPSC-

derived MNs. In contrast, no defect was observed with SMA rescue hiPSC-derived MNs. In addition, we also measured a significant decrease in the frequency of calcium waves in SMA skeletal muscle cells independently of the genotype of hiPSC-derived MNs which is consistent with the myogenic defect observed in SMA skeletal muscle cells.

### **Correction of SMA-related neuronal and muscular phenotypes by JNK and GSK3 inhibitor compounds.**

Since the NMJ formation defect is regarded as an important sign preceding the motor neuronal loss, drugs capable rescue the NMJ pathology may represent promising therapeutic candidates. Hence, we assessed whether kenpaullone, different JNK inhibitors (SP600125, CC401), more specific JNK3 inhibitors (SR3576, IQ3) and GSK3 inhibitors (Tideglusib, Chir) can normalize the different phenotypes previously identified. We first observed the capacity of these compounds to significantly increase SMA hiPSC-derived MN survival (**Figure 8A,B**). A benefit effect was also observed on the myogenic alteration observed in SMA skeletal muscle cells (**Figure 8C**).

Interestingly, the earliest pre- and post-synaptic defects observed even before SMA MN cell death, were at least partially restored after JNK and GSK3 inhibition treatments (**Figure 8D-F**). Significant effects were detected on neurite outgrowth and AChR clustering in SMA conditions compare to control (**Figure 6D-F**). At the functional level, Ca<sup>2+</sup> oscillations induced hiPSC-derived MNs were measured at the level of skeletal muscle cells after kenpaullone treatment. The significant decrease in the frequency of calcium transient observed in SMA co-culture conditions is restored by kenpaullone treatment (**Figure 8G**).

## **DISCUSSION**

In this study, we developed a target-agnostic based drug screenings revealing the potential of JNK and GSK3 inhibitors to normalize the cellular phenotypes associated to SMA-specific neuromuscular defects.

JNK and GSK3 inhibitors were identified after the observation that kenpaullone was capable to rescue SMA hiPSC-derived MN death. As previously described in the context of another neuromuscular disease, the amyotrophy lateral sclerosis (ALS) (Yang et al., 2013), we indeed first evaluated the potential of kenpaullone in the context of SMA. Whereas kenpaullone showed a protective effect on SMA hiPSC-derived MNs, this effect is not specific to SMA MNs, as a similar effect was observed in ALS conditions (Yang et al., 2013). Consistent with this, kenpaullone ameliorated the SMA phenotype in hiPSC-derived MNs independent of SMN induction. Kenpaullone is classified as an inhibitor of several cyclin dependent kinases (CDKs), c-Jun N-terminal kinase (JNK) and GSK3 signaling pathway. Our data suggested the benefit effect of kenpaullone is independent of the CDKs inhibition (Tejero et al. 2020). However, our results demonstrated that the protective effect of kenpaullone was mediated through an inhibition of JNK and GSK3 signaling pathway.

The c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway plays a critical role in cell survival and death and implicated in the pathogenesis of human diseases, including cancer and

neurodegenerative disorders (Sabapathy 2012). Activation of the JNK signaling pathway has been shown to mediate caspase-dependent degeneration of the spinal cord motor neurons in SMA mice and the spinal cords of SMA patients. The JNK group of MAP kinase is encoded by the *Jnk1*, *Jnk2* and *Jnk3* genes. Neurodegeneration in SMA seems to be mediated by neuron-specific JNK3 isoform. Genetic inactivation of *Jnk3* gene in mice with SMA results in amelioration of SMA phenotype including reduced loss of spinal motor neurons, increased overall growth and increased lifespan of mice with SMA (Genabai et al. 2015; Schellino et al. 2018). However, contrasting results have reported no differences in stress-activated JNK-c-Jun signaling in MNs of SMN $\Delta$ 7 SMA mice and SMA human spinal cord compared to healthy tissue (Simon et al. 2017; Pilato et al. 2019). These inconsistencies can be ascribed to different time points considered for the analyses. JNK and/or other (pro-apoptotic) molecular pathways can be activated differently during the cell life: probably the analysis of their expression in MNs at later phases of the disease might not reveal any differences in SMA tissue, because at this late-stage MN degeneration is already too advanced.

Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) is a cellular serine/threonine protein kinase that is involved in glycogen metabolism. GSK-3 is encoded by two paralogous genes, GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$ . GSK-3 $\beta$  is the more studied and better characterized GSK-3 isoform because of its predominant expression in the majority of cells and tissues. Recent studies have suggested a possible role of GSK-3 $\beta$  in neuromuscular disorder, such as ALS (Martínez-González et al., 2021) and Myotonic Dystrophy type 1 (DM1) (M. Wang et al., 2019; Wei et al., 2013). A previous study has also suggested the involvement of GSK-3 $\beta$  in SMA and demonstrated that GSK-3 $\beta$  inhibition was neuroprotective in a SMA-related model of oxidative stress-induced neurodegeneration. Our findings suggested that JNK, and even specifically JNK3, and GSK-3 $\beta$  inhibition could be potential targets to reduce neurodegeneration. Furthermore, JNK and GSK-3 $\beta$  inhibitions indicated a positive role of these kinase signaling pathways in myogenic differentiation. These results were in concert with the role of JNK signaling in stimulating myofibers growth through myostatin/SMAD inhibition (Lessard et al. 2018). Furthermore, GSK-3 inhibitors have been shown to mimic the activation of Wnt signaling and potentially increase muscle differentiation (Theeuwes et al. 2017; Suzuki et al. 2015). In our SMA human *in vitro* co-culture system, we also demonstrated that the pharmacological inhibition of the JNK and GSK-3 signaling pathway, leads to muscle improvement in addition to increase MN cell survival. These results raised an important issue about the clinical transferability of these compounds. Although some selective inhibitors of JNK have been identified in the field of cancer therapies, their clinical studies were relatively less convincing. For example, CC-401, a seconded generation of ATP competitive inhibitors of JNK, have shown a high capacity in the inhibition of JNK and is also seen to show antineoplastic activity. However, a phase I clinical trial using CC-401 for acute myeloid leukemia was discontinued (Messoussi et al. 2014; Wu et al. 2020). The lack of efficacy and the side effects are highly possible, at least in part, due to the lack of selecting and identifying of a subset of patients who would respond positively to anti-JNK therapies (Messoussi et al. 2014). On contrary, GSK-3 $\beta$  inhibitor and more specifically, Tideglusib, a small thiadiazolidindione (TDZD), has shown neuroprotective, anti-inflammatory, and neurogenic properties in different neurodegenerative models (Morales-Garcia et al. 2012; Martínez-González et al. 2021; Luna-Medina et al. 2007). Furthermore, good safety, tolerability, and efficacy have been reported in clinical trials for different neurological

diseases, Alzheimer disease (Lovestone et al. 2015), Autism Spectrum Disorder (Anagnostou et al. 2018), as well as neuromuscular disorders for which this treatment is currently in phase III trials for Myotonic Dystrophy (Horrigan et al. 2020) (Clinical trial Identifier: NCT03692312) and phase II trials for ALS (Clinical trial Identifier: NCT05105958).

Recent studies in SMA animal models have shown that in the pathogenesis of SMA, pathological changes of the NMJ precede the motor neuronal loss (Ling et al. 2012; Murray et al. 2010). Synaptic defects were reported at the NMJ of SMA mice included abnormal synaptic transmission (Kong et al. 2009) and in human (Martínez-Hernández et al. 2013). Since obstacles still existed with obtaining human specimens from either biopsy or post-mortem samples, research efforts aimed at developing appropriate humanized SMA cellular models could be extremely relevant to identify new therapeutic strategies for SMA. Recent advances in stem cell biology, especially for the development of hiPSCs, and have fueled the prospect to establish a more relevant human cellular model for SMA disease (Schmid and DiDonato 2007; Makarev et al. 2015; Ebert et al. 2009). In this context, few human co-culture systems have been developed and have identified NMJ impairments (Braun et al. 1995; Corti et al. 2012; Yoshida et al. 2015). For example, co-culturing hiPSC-derived SMA MNs and murine primary muscle cells was found to present defects in cluster acetylcholine receptors (AChRs) (Yoshida et al. 2015). However, these models are based on inter-species co-culture models with human and rodent cells. It was thus critical to evaluate the NMJ formed by SMA patients' MNs and especially since the contributing role of muscle in SMA remains controversial. Hence, a strategy of co-culture between hiPSC-derived spinal MNs and human primary skeletal muscle cells were developed using 384 micropatterned plates. In this model, different conditions were generated: WT, SMA and hybrid co-cultures to better understand the contribution of spinal MNs and skeletal muscle cells in SMA disease. Hence, the objective is to identify whether the presence of the SMA mutation can impact this inter-cellular system and if so, use this model for drug screening. Our results indicated that SMA co-cultures between SMA hiPSC-MNs and SMA muscle cells harbor several defective features both at the neuronal level and at the muscular level. Indeed, we observed a defective myogenic fusion, an abnormal acetylcholine receptor clustering as well as a decreased neurite outgrowth. It must be highlighted that these defects occur prior the MN degeneration. Furthermore, we demonstrated an effect of SMA hiPSC-MNs on control muscle cells, such as an impaired calcium homeostasis. Taken together, in this study we developed a reliable and functional human *in vitro* model that recapitulate SMA phenotypic defects with a large number of parameters, which seems to be available for a large panel of neuromuscular disorders.

In conclusion, even though it is commonly accepted that approaches aimed at increasing SMN levels would have therapeutic benefit in treating the disease, it remains unclear that these treatments could be effective in the large spectrum of SMA patients. In this study we demonstrated that our hiPSC-based models are useful to develop a target agnostic approach where we did not target SMN but its related phenotypes. We thus developed a model, suitable for drug screening, that allows the study of "early born" spinal MNs and the identification of compounds before MNs degeneration that might be more specific and thus more efficient in SMA disease. Furthermore, we also developed a reliable and functional SMA coculture system that could be useful in all neuromuscular disorder for identification or validation of drug screening.

## MATERIALS AND METHODS

### Human induced pluripotent stem cells

Human induced pluripotent stem cell lines (hiPSC) were generated by reprogramming Coriell Biorepository fibroblasts derived from non-affected and SMA affected patients as previously described (**Table S1**) (Maury et al. 2015). Three independent clones hiPSC were generated from each line of healthy fibroblasts GM03814 and C03. Similarly, 3 independent clones of hiPSC were generated from each fibroblast line issues from two type SMA type 1 patients (GM03813 or GM00232). Informed consents were obtained from all the patients included in this study, complying with the ethical guidelines of the institutions and with the legislation requirements. Experimental protocols were approved by the French minister of health (2019-A02599-48). In addition to these hiPSC lines, an isogenic control line was generated from one SMA hiPSC line (GM03813) in which a plasmid containing SMN (pEF1aFlagbiotagSMN-PGKpuro, kindly gift of H. Wichterle and S. Nedelec) was stably transfected. Briefly, cells were nucleofected with 5mg of linearized plasmid (ClaI enzyme) (AMAXA Program 23). Cells were selected for 8 days with puromycin (1µg/ml). The integration of the transgene was validated by immunostaining for the Tag and by western blot for SMN.

All the different hiPSC lines were grown on culture dishes-coated vitronectin (Gibco) and maintained in iPS-Brew XF medium (Miltenyi Biotec) as previously described (Mérien et al. 2021). Cell passaging was performed manually every 5 days and culture medium was changed every two days.

### Generation of spinal motor neurons from hiPSCs

The conversion of hiPSC into spinal MNs was performed as previously described (Maury et al. 2015). Briefly, hiPSC were dissociated enzymatically using Stem Pro Accutase (ThermoFisher) for 5 min and plated in 25cm<sup>2</sup> flask (Dutscher) or spinner flask (Corning) at a density of 0.2x10<sup>6</sup> cell/mL in a total volume of respectively 10mL and 70mL. Cells were incubated in suspension in a neural induction medium containing of DMEM/F12 and Neurobasal medium supplemented with B27 (Life Technologies), N2 Supplement (Life Technologies), Pen-Strep 0.1%, β -ME 0.1% (Life Technologies), Ascorbic Acid (0.5 µM, Sigma-Aldrich), Chir99021 (3 µM, Stemgent), SB431542 (20 µ M, Tocris), LDN 193189 (0.2 µ M, Stemgent) and Y-27632 (10 µM, Stemcell). After 2 days, caudalization of the neural progenitors was obtained by addition of retinoic acid (RA 0.1 µM) and smoothened agonist (SAG, 0.5 µM). After 1 week in suspension, brain derived neurotrophic factor (BDNF, 10 ng/mL), glial-derived neurotrophic factor (GDNF, 10 ng/mL), and N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S- phenylglycine t-butyl ester (DAPT, 10 nM) were added in the medium without SB431542 and LDN193189. Between day 10 and 14, MN progenitors are converted into MNs. At this step (day 10) embryoid bodies (EBs) were dissociated into single cells with Trypsin-EDTA and plated either in 384-well plates (Corning) or cell culture dish coated with poly-ornithin (20 µg/ml, Sigma-Aldrich) and 5 g/ml laminin (Invitrogen) into the same medium with Y-27632. MNs were obtained after 14 days of differentiation and can be assessed by immunolabeling for Islet1. They can be maintained for at least another 10 days for the maturation of spinal MNs.

### **Co-culture of human iPSC-derived spinal MN and human skeletal muscle cells**

Human primary as well as immortalized non affected and SMA myoblasts were obtained from the Myobank-AFM and provided by Vincent Mouly. Skeletal muscle cells were obtained from a quadriceps muscle biopsy of a 5 day-old unaffected infant (CHQ or Ctl) (Edom et al. 1994), a paravertebral muscle biopsy of a 11-year-old infant patient suffering from SMA (KM432-7PV or SMA type I) and a paravertebral muscle biopsy of a 7-year-old infant patient suffering from SMA (KM1150-11PV or SMA type II). Primary cells were isolated from skeletal muscle as described previously (Chaouch et al. 2009). These cells were expanded and differentiated as previously described. Briefly, primary and immortalized myoblasts were expanded in a mix of 199 medium/Dulbecco modified Eagles minimal essential medium (1:4 ratio) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS), 25 µg/mL fetuin, 0.5 ng/mL basic fibroblast growth factor, 5 ng/mL epidermal growth factor, 5 µg/mL insulin. Cells were then cultivated in a growth medium consisting of DMEM-F12 glutamax (Life Technologies) supplemented with 20% FBS (Sigma-Aldrich) and 0,1% penicillin/streptomycin (Life Technologies). Myogenic differentiation was induced by switching growth medium to DMEM supplemented with 2% horse serum (Life Technologies).

For co-culture, spinal MNs must be differentiated from hiPSC as described previously, but the embryoid bodies are dissociated at day 14 of differentiation and frozen. 384 micropatterned-well plates were designed and provided by CYTOO SA (Young et al. 2018). The co-cultures were performed as previously described (Tahraoui et al., 2022 - submitted). Briefly, myoblasts were plated at a density of 5 500 cells per well in myoblast growth medium (DMEM/F12-glutamax supplemented with 20% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich) and 0.1% penicillin-streptomycin (ThermoFisher)) with Y- 27632 (10 µM, Stemcell). After 2 days, the growth medium was replaced by the differentiation medium (DMEM/F12-glutamax supplemented with 2% horse serum (ThermoFisher)). On day 4, the hiPSC-derived MNs were thawed and plated at a density of 8 000 cells per well in N2B27 medium supplemented by brain derived neurotrophic factor (BDNF, 10 ng/mL, Peprotech), glial-derived neurotrophic factor (GDNF, 10 ng/mL, Peprotech), N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S- phenylglycine t-butyl ester (DAPT, 10 µM, Tocris) and Y- 27632 (10 µM, Stemcell). Cultures have been maintained up to 11 days which correspond to 4 days of myogenic differentiation and 7 days of co-culture with hiPSC-derived MNs.

### **Treatment of motor neuron cultures with small molecules**

To analyze the effect of kenpaullone and other JNK or GSK3 inhibitors, MN progenitors were plated into poly-l-ornithine/laminin-treated 384-well plates at 3 000 cells per well in N2B27 medium without growth factors. After 4 days of differentiation, "early" spinal MNs were treated with the different compounds (Tocris) by using the Bravo Automated Liquid Handling Platform (Agilent Technologies). Cells were treated every 3 days for the next 10 days (**Table S2**). A solution of 0.1% DMSO (MilliporeSigma) was used as a negative control. After 10 days, the cell viability was quantified.

### **Immunostaining**

After fixation with 4% PFA (Electron Microscopy Sciences) for 7 min at room temperature, cells were incubated overnight at 4°C with primary antibodies (listed in **Table S3**). The cells



were washed 3 times in PBS buffer and incubated for 1h at room temperature with appropriated Alexa fluorescent labeled secondary antibodies (Invitrogen, 1:1 000) and Hoechst (5 µg/mL).

### **Image acquisition and analysis**

Image acquisitions were performed using the automated imaging Cell Insight CX7 HCS Platform (Cellomics Inc). Masks and algorithms were developed with the HCS Reader software for automated quantification of the percentage of cells stained for ISL1, Caspase-3 and p-c-Jun, compared to the total number of cells. Co-culture images were acquired using Spinning Disk microscopy (Zeiss) with 20X objective. Each image was taken with z-stack and an orthogonal view was performed on Fiji Software. By using Fiji software, AChR clustering were quantified by manually measuring the total area as well as the mean size of AChR clusters (Tahraoui et al., 2022 – submitted). By application of background correction and intensity threshold, the neuritic arborization was quantified by the determination of the neuritic length per micropattern. Islet1 quantification was determined by automatically counting the number of Islet1-positive cells by micropattern. Myotube area was quantified by using Fiji Software to quantify total area of cells stained by MF20 antibody per micropattern.

### **Protein extraction and Immunoblotting**

Western blots analyses were performed as previously described (Pourtoy-Brasselet et al. 2021). Briefly, cells were lysed in RIPA 1X buffer (Sigma-Aldrich) supplemented with 1% protease inhibitors (Sigma-Aldrich) and 10% phosphatase inhibitor (Roche). Protein samples were quantified with Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific) with CLARIOstar Plus Instrument (BMG Labtech). Protein extracts (10 µg) were loaded on a 4-12% SDS-PAGE gradient (NuPage Bis–Tris gels, Invitrogen) and transferred onto Gel Transfer Stacks Nitrocellulose membranes (Invitrogen) using the iBlot2 Dry Blotting System (Invitrogen). Membranes were then incubated overnight at 4°C with following primary antibodies: mouse anti-SMN (610647, BD Transduction, 1:500), rabbit-GSK-3 $\alpha/\beta$  (D75D3, Cell Signaling, 1:500) and rabbit-p-GSK3  $\alpha/\beta$  (Ser21/9) (D17D2, Cell signaling, 1:500). Following 1h incubation with the fluorescent secondary antibodies (1:10,000, Li-Cor), blots were revealed with Odyssey CLx Imaging System (Li-Cor). Equal protein loading was verified by the detection of  $\beta$ -Actin (1:5 000, Li-Cor).

### **HTRF Assay to quantify SMN protein expression**

SMN protein was also quantified using Homogeneous Time Resolved Fluorescence (HTRF, Cisbio Bioassays) according to the manufacturer's protocol. This technology allows the detection and quantification of SMN protein in 384 well plate format. For this, cells were lysed in 15 µL of lysate buffer and 10 µL of cell lysate were transferred to a 384-well small volume white plate containing 5 µL of the antibody solution (1:100 dilution of anti-SMN d2 and anti-SMN cryptate) (Cisbio). The plate was incubated overnight at room temperature. Fluorescence was measured at 665 nm and 620 nm on a CLARIOstar microplate reader (BMG Labtech). Ratio values of (665 nm emission/620 nm emission)  $\times$  10 000 were used to calculate  $\Delta F$  (%) according to the following equation:

$$\Delta F (\%) = [(\text{Sample ratio} - \text{Negative control ratio}) / \text{Negative control ratio}] \times 100.$$

### **Calcium imaging**

Cell culture medium was replaced with a Ca<sup>2+</sup>-containing HEPES buffered salt solution (Ca<sup>2+</sup>-HBSS) composed of (mM): 135 NaCl, 5.4 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, and 10 glucose; pH=7.4 set with NaOH). Cells were then incubated with 2 μM of Cal520 probe (Abcam, 1:1 000) diluted in Ca<sup>2+</sup>-HBSS. After 20 min, cells were washed twice with Ca<sup>2+</sup>-HBSS solution and kept at RT for 15 min prior to recording in controlled atmospheric Zeiss Spinning Disk Microscopy. Acquisitions were performed at 200 ms intervals. Images were processed and analyzed on Fiji Software using ROI manager to quantify fluorescence intensity inside each myotube (= 1 ROI) and corrected for background. The curve of calcium response is represented as time as function of the  $\Delta F/F_0$  ratio in which F<sub>0</sub> represents the basal fluorescence intensity whereas  $\Delta F$  represents the mean fluorescence (Tahraoui et al., 2022 – submitted).

### **Statistical analysis**

All quantitative data were analyzed with Prism 8. Values are represented as  $\pm$  SD. Student's t-test was used to compare data between two groups (\*p < 0.05; \*\*p < 0.005; \*\*\*p < 0.0005; \*\*\*\*p < 0.0001). One-way analysis of variance (ANOVA) was performed to compare data among three or more groups, followed by a post-hoc Tukey's multiple comparison test. Values of p < 0.05 were considered as statistically significant (\*p < 0.05; \*\*p < 0.005; \*\*\*p < 0.0005; \*\*\*\*p < 0.0001).

### **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

C.J., J.C. and C.M.: conception and design. C.J. and C.M.: investigation and data collection. C.J., J.T., J.C., J.P., C.L., and C.M.: formal analysis and interpretation. V.M. and C.M.: provision of different cellular resources. C.M.: financial support. C.J. and C.M.: manuscript writing.

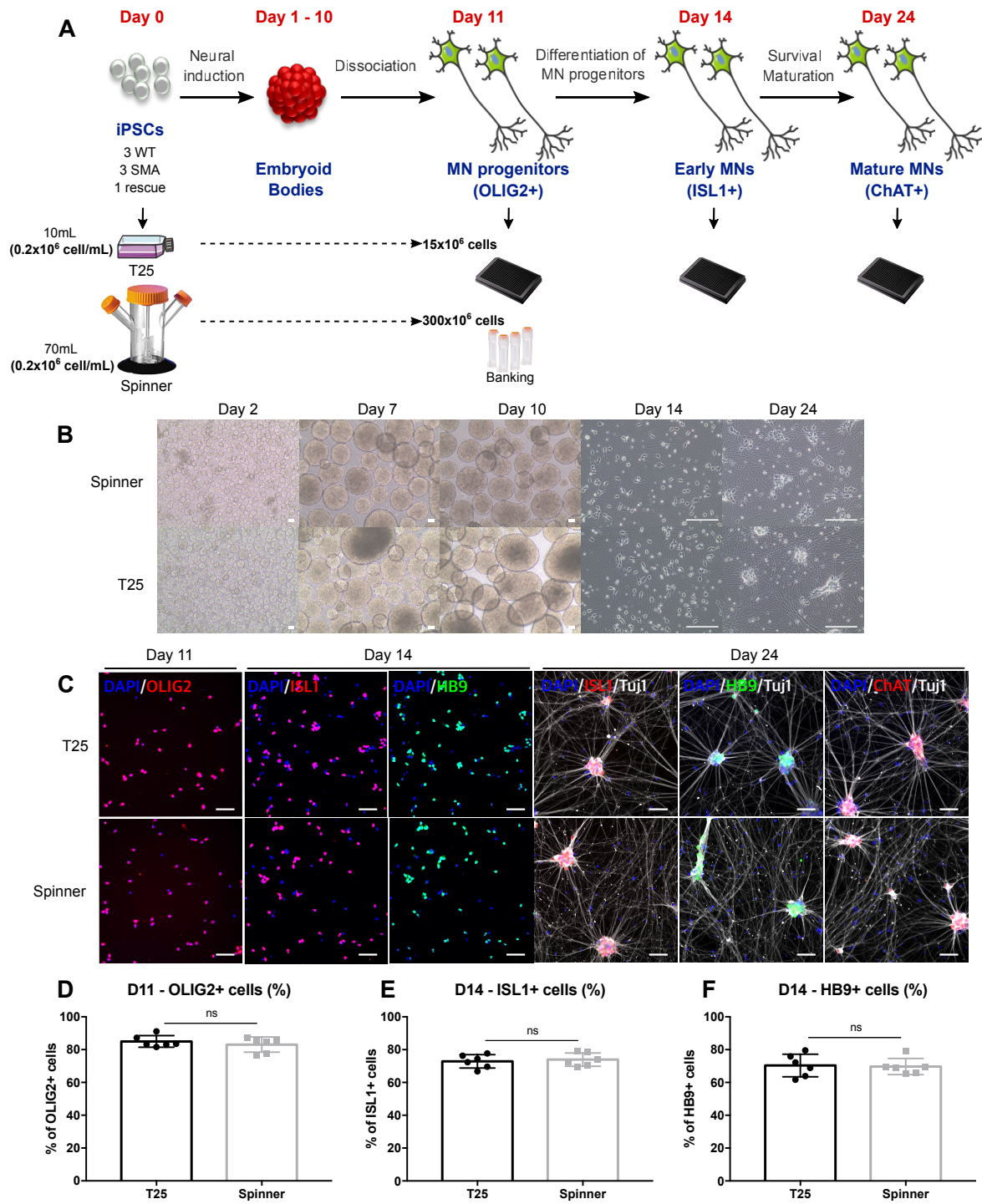
### **DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST**

The authors declare no conflicts of interest

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

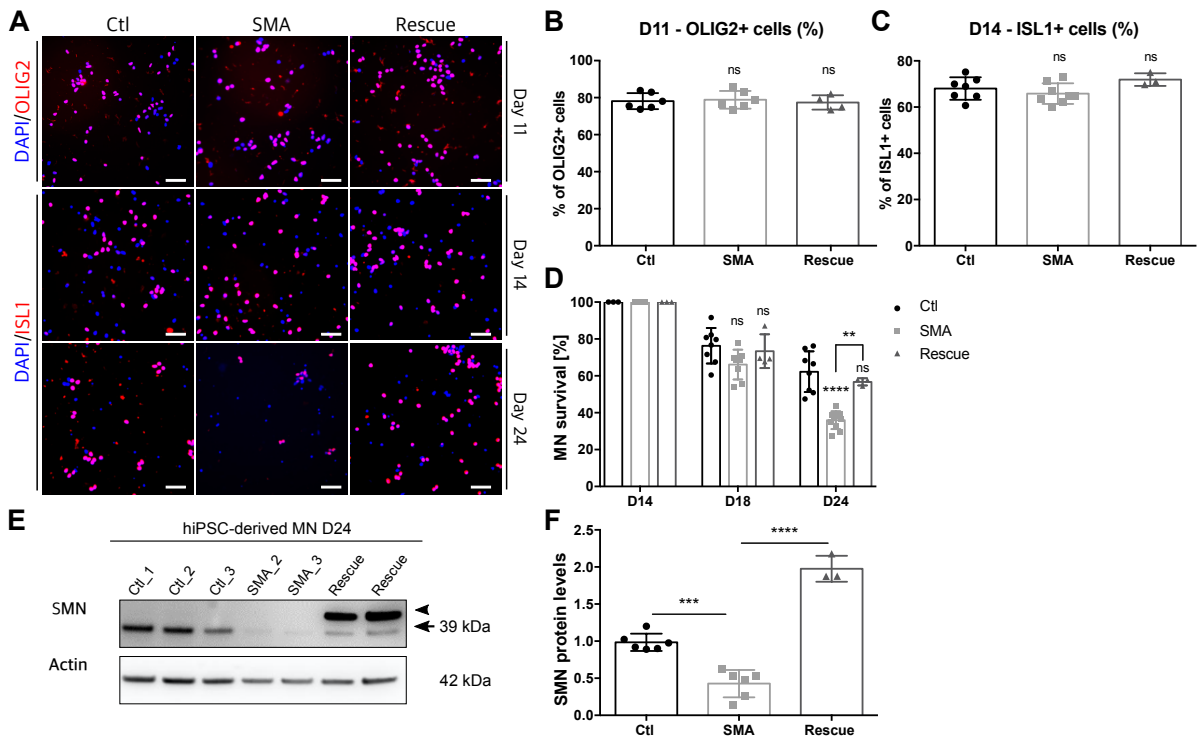
I-Stem is part of the Biotherapies Institute for Rare Diseases (BIRD) supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon). This project was supported by grants from Laboratoire d'Excellence Revive (Investissement d'Avenir; ANR-10-LABX-73), the doctoral school « Innovation Thérapeutique, du fondamental à l'appliqué » (ED 569) from Paris Saclay University and Agence Nationale de la Recherche (ANR). We thank Hynek Wichterle and Stéphane Nedelec for the kindly gift of rescue hiPSC line.

**Figure 1**



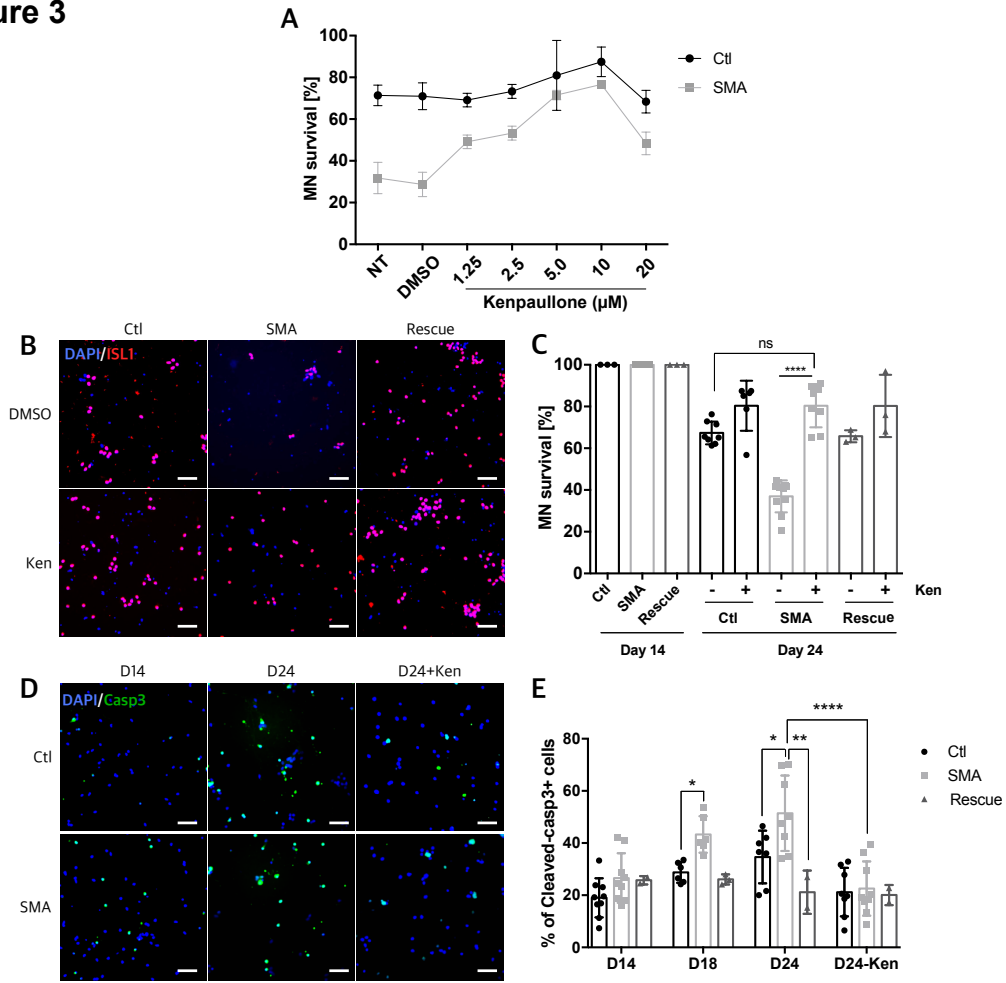
**Figure 1: Large-scale generation of human spinal MNs from non-affected hiPSC.** **A.** Schematic representation of the differentiation protocol used to convert hiPSCs into spinal MNs. **B.** Representative bright-field images of EBs in spinner flask and T25 flask. Scale bar: 100  $\mu$ m. **C.** Representative images of immunolabeling for motor neuronal markers at different time points of the differentiation: OLIG2 (red) progenitor marker on day 11, ISL1 (red) and HB9 (green) MN markers on days 14 and day 24, ChAT (red) and Tuj1 (white) mature MN markers on day 24 in control cells. Scale bare: 20  $\mu$ m. **D-F.** Quantification of the percentage of OLIG2<sup>+</sup> MN progenitors on day 11 (D) and ISL1<sup>+</sup> (E) and HB9<sup>+</sup> (F) MNs on day 14. Data represent the mean values  $\pm$  SD from 3 independent experiments perform on 2 different control hiPSC lines. Statistics were calculated using the Student's t-test ( $p > 0.05$ , ns: not significant).

**Figure 2**



**Figure 2: Phenotypic characterization of hiPSC-derived spinal MN from control, SMA and rescue cell lines.** **A.** Representative images of OLIG2 (red) MN progenitor marker on day 11 and ISL1 (red) MN marker on days 14 and day 24 of differentiation in control, SMA and rescue cells. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ . **B,C.** Quantification of the percentage of OLIG2<sup>+</sup> MN progenitors on day 11 (B), and ISL1<sup>+</sup> MNs on day 14 (C) on control, SMA, and rescue cells. **D.** Quantification of MNs survival using a combination of DAPI and ISL1 staining at days 18 and 24, normalized on day 14. **E,F.** Western blot analysis of SMN protein expression in control, SMA and rescue MNs after 24 days of differentiation.  $\beta$ -Actine was used as a housekeeping protein for normalization. Data represent the mean values  $\pm$  SD from at least 3 independent experiments perform on 3 control, 4 SMA and 1 rescue cell lines. Statistics were calculated using an ordinary One-Way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test ( $p > 0.05$ , ns: not significant, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

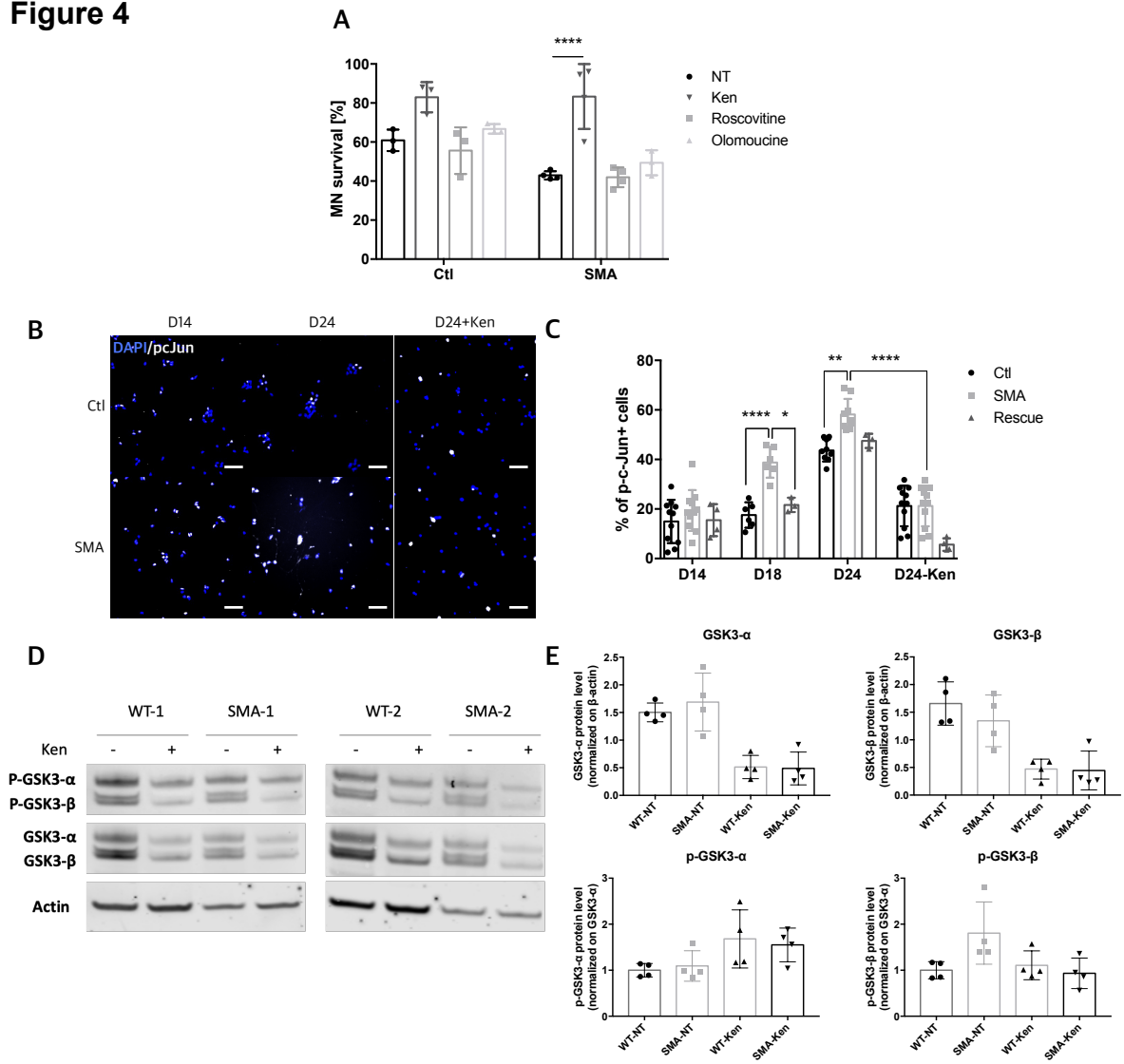
**Figure 3**



**Figure 3: Kenpaullone restores SMA-relevant phenotypes in SMA hiPSC-derived spinal MN.** **A.** Dose-response analysis for MN survival in control and SMA hiPSC-derived spinal MN treated with 5 different concentrations of Kenpaullone for 10 days (from day 14 to day 24 of differentiation). **B,C.** Immunostaining and quantification of ISL1 (red) in control, SMA and rescue MNs (day 24) treated or not with kenpaullone (10  $\mu$ M) for 10 days. **D,E.** Immunostaining and quantification of Cleaved-caspase-3 (green) in SMA compared to control and rescue MNs at day 14, day 18 and day 24 with or without kenpaullone treatment.

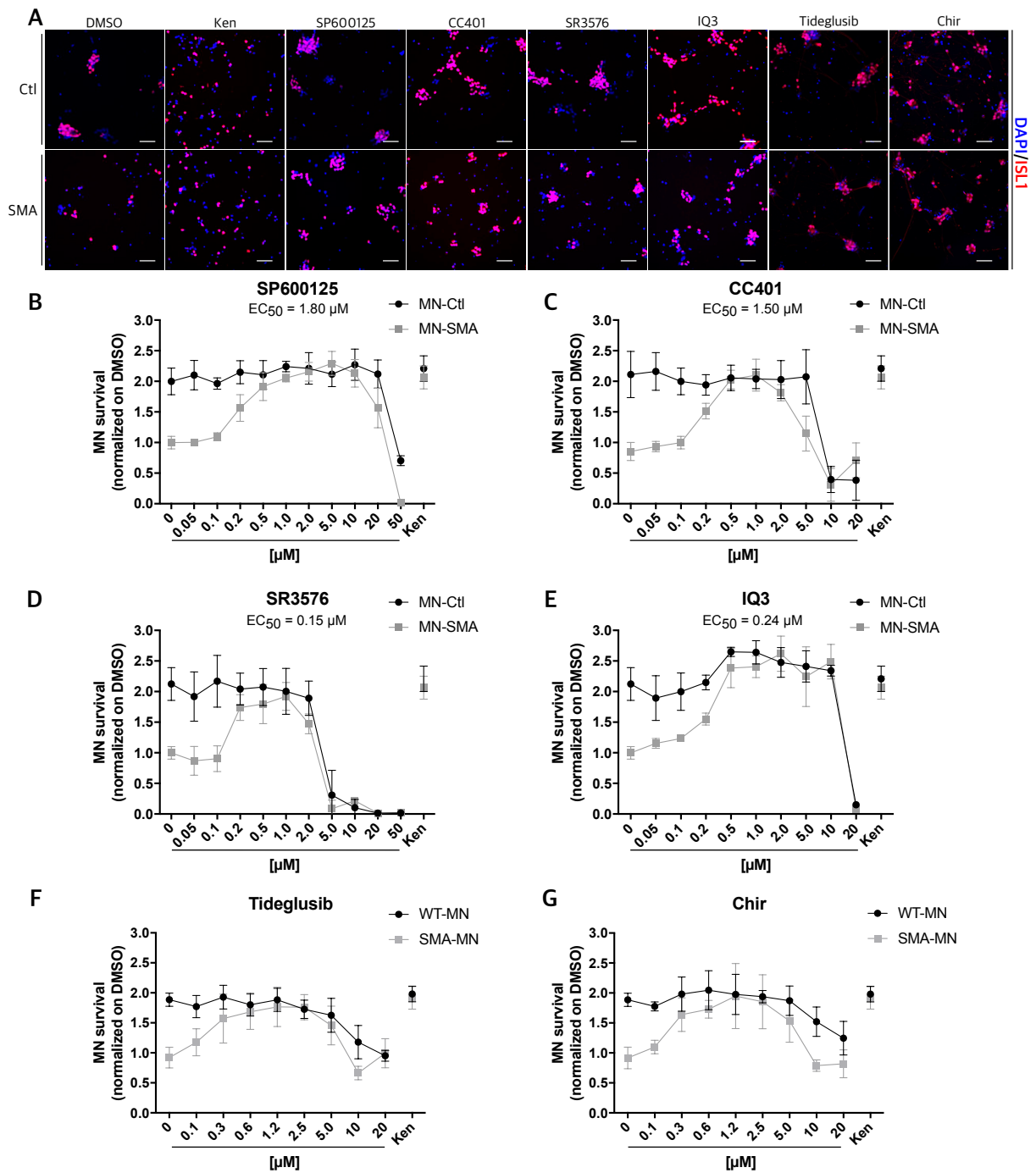


**Figure 4**



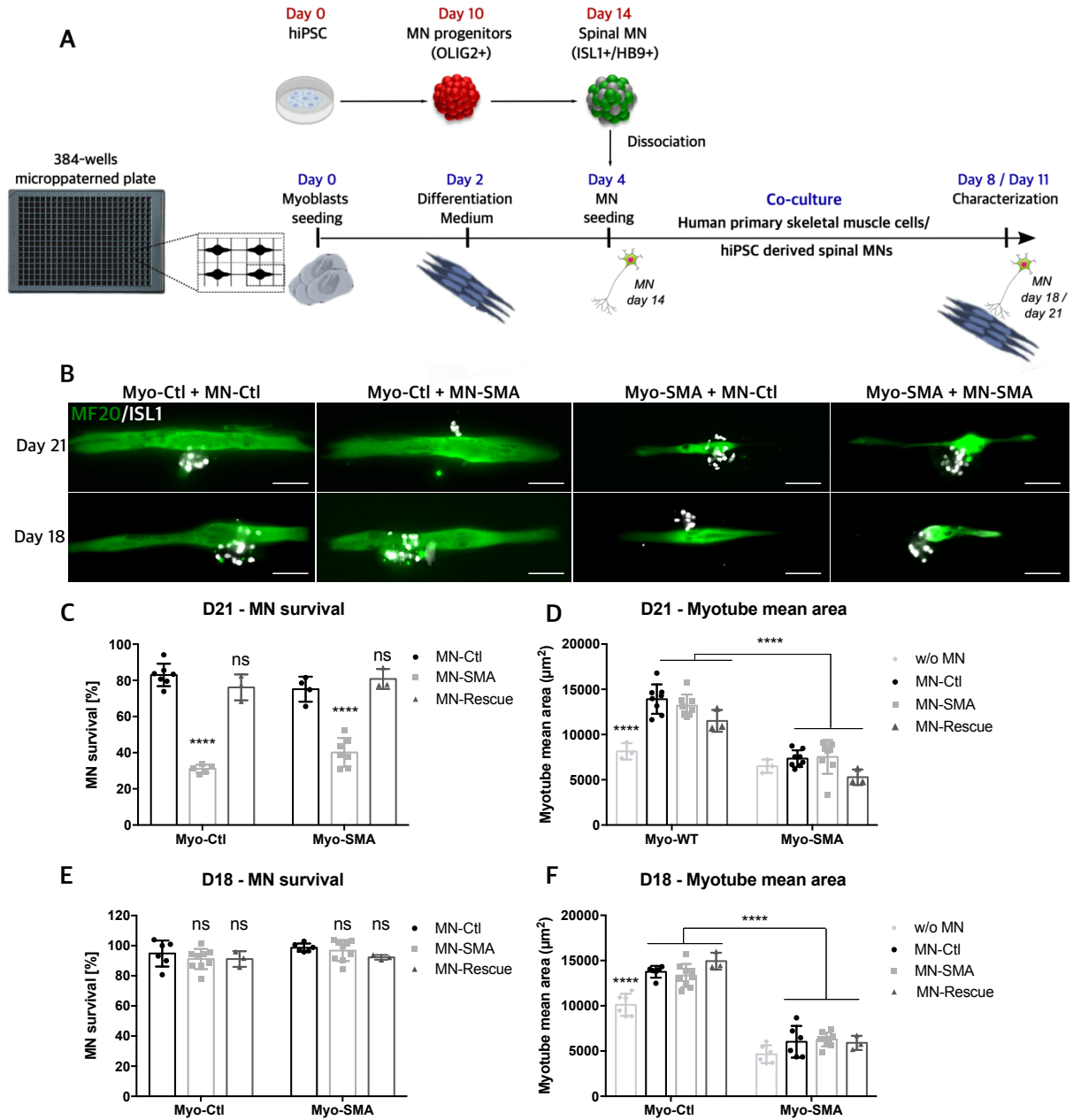
**Figure 4: Mode of action of Kenpaullone.** **A.** Quantification of MNs survival after kenpaullone treatment compared to specific Cdks inhibitors: roscovitine (Rosco-5  $\mu\text{M}$ ) and olomoucine (Olo-5  $\mu\text{M}$ ), on control and SMA MNs (day 24) treated for 10 days. **B,C.** Immunostaining and quantification of p-c-Jun (white) in control, SMA and rescue MNs at day 14, day 18 and day 24 treated or not with kenpaullone (10  $\mu\text{M}$ ) for 10 days. **D-F.** Western Blot analysis of phospho-GSK-3 $\alpha$  (Y2XX)/ $\beta$  (Y216) and total GSK-3 $\alpha$ / $\beta$  in control and SMA MNs treated or not with Kenpaullone.  $\beta$ -Actine was used as a housekeeping protein for normalization. Data represent the mean values  $\pm$  SD from at least 3 independent experiments perform on 3 control, 3 SMA and 1 rescue cell lines. Statistics were calculated using the One-Way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test ( $p > 0.05$ , ns: not significant, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

**Figure 5**



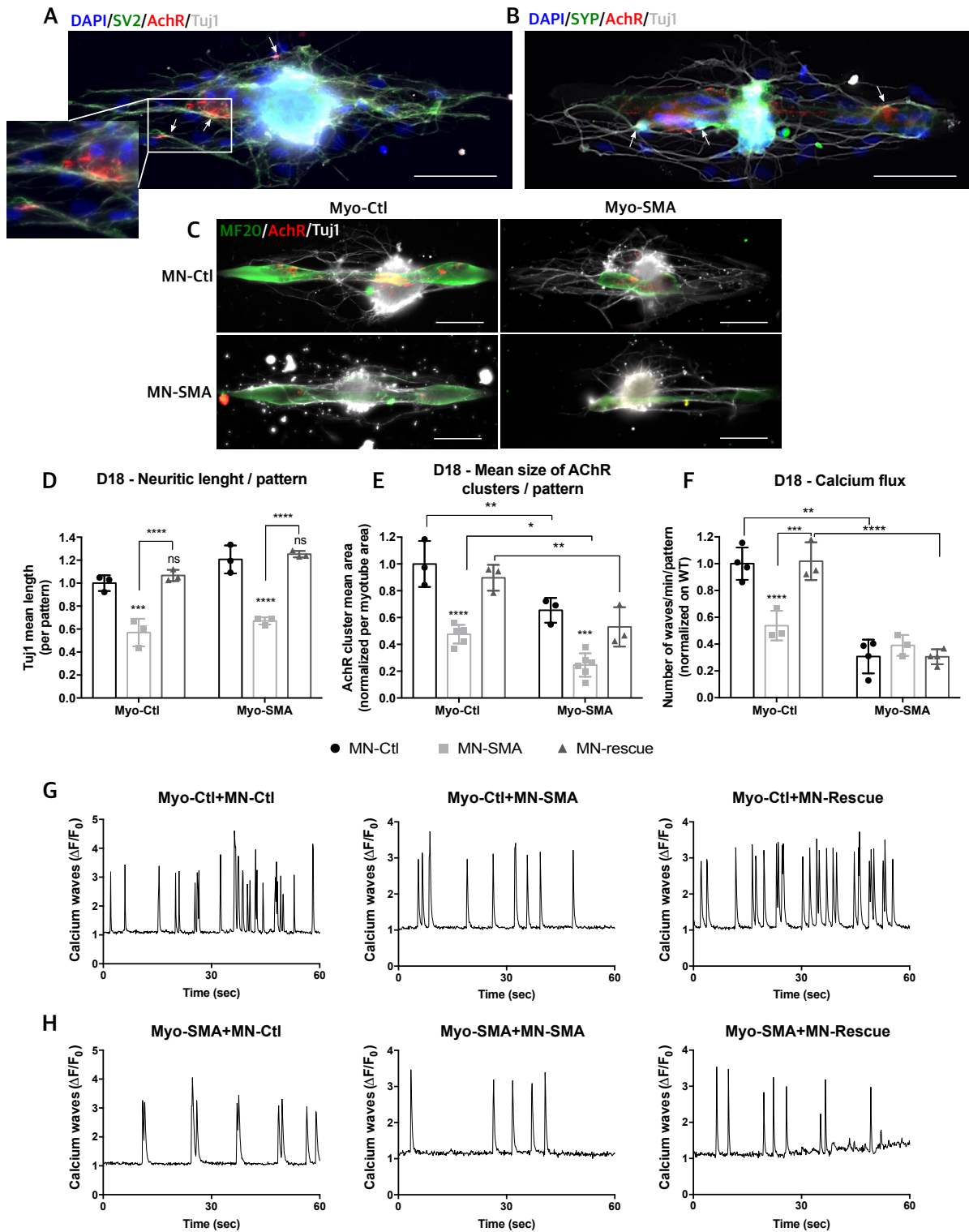
**Figure 5: Effect of JNK and GSK3 inhibitor compounds on hiPSC-derived MN survival. A-G.** Evaluation of 2 pan JNK inhibitor compounds (B,C), 2 JNK3 inhibitor compounds (D,E), and 2 GSK3 inhibitor compounds. Dose-response activities were measured on control and SMA MNs survival using a combination of DAPI (blue) and ISL1 (red) staining at day 24 normalized on day 14 of differentiation. Kenpaullone (10 $\mu$ M) was used as a positive control. Data represent the mean values  $\pm$  SD from 3 independent experiments perform on 1 control and 1 SMA hiPSC-derived MN lines, with 4 technical replicates per plate.

**Figure 6**



**Figure 6: Human SMA *in vitro* co-culture between hiPSC-derived motoneurons and skeletal muscle cells.** **A.** Schematic representation of the co-culture protocol and timeline based on hiPSC-derived spinal MN and human skeletal muscle cells in micropatterned 384-well plate. **B.** Representative images of immunostaining (myosin heavy chain MF20 in green for myotubes and ISL1 in white for MNs) of co-culture on MN day 18 and 21 of differentiation. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ . **C,D.** Quantification of MNs survival (C) and the mean of myotube area per pattern (D) on day 21 of MN differentiation in control, SMA, rescue and hybrid co-cultures (data are presented as the mean  $\pm$  SD of the 1 control, 1 SMA hiPSC-derived MN and 1 control and 1 SMA skeletal muscle cells with 3 replicates per conditions). **E,F.** Quantification of MNs survival (E) and myotube mean area per pattern (F) on day 18 of MN differentiation in control, SMA, rescue and hybrid co-cultures. Data represent the mean values  $\pm$  SD from at least 3 independent experiments performed on 2 control, 2 SMA and 1 rescue hiPSC-derived MN lines co-cultured with 1 control or 1 SMA primary skeletal muscle cells. Statistics were calculated using the One-Way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test ( $p > 0.05$ , ns: not significant, \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

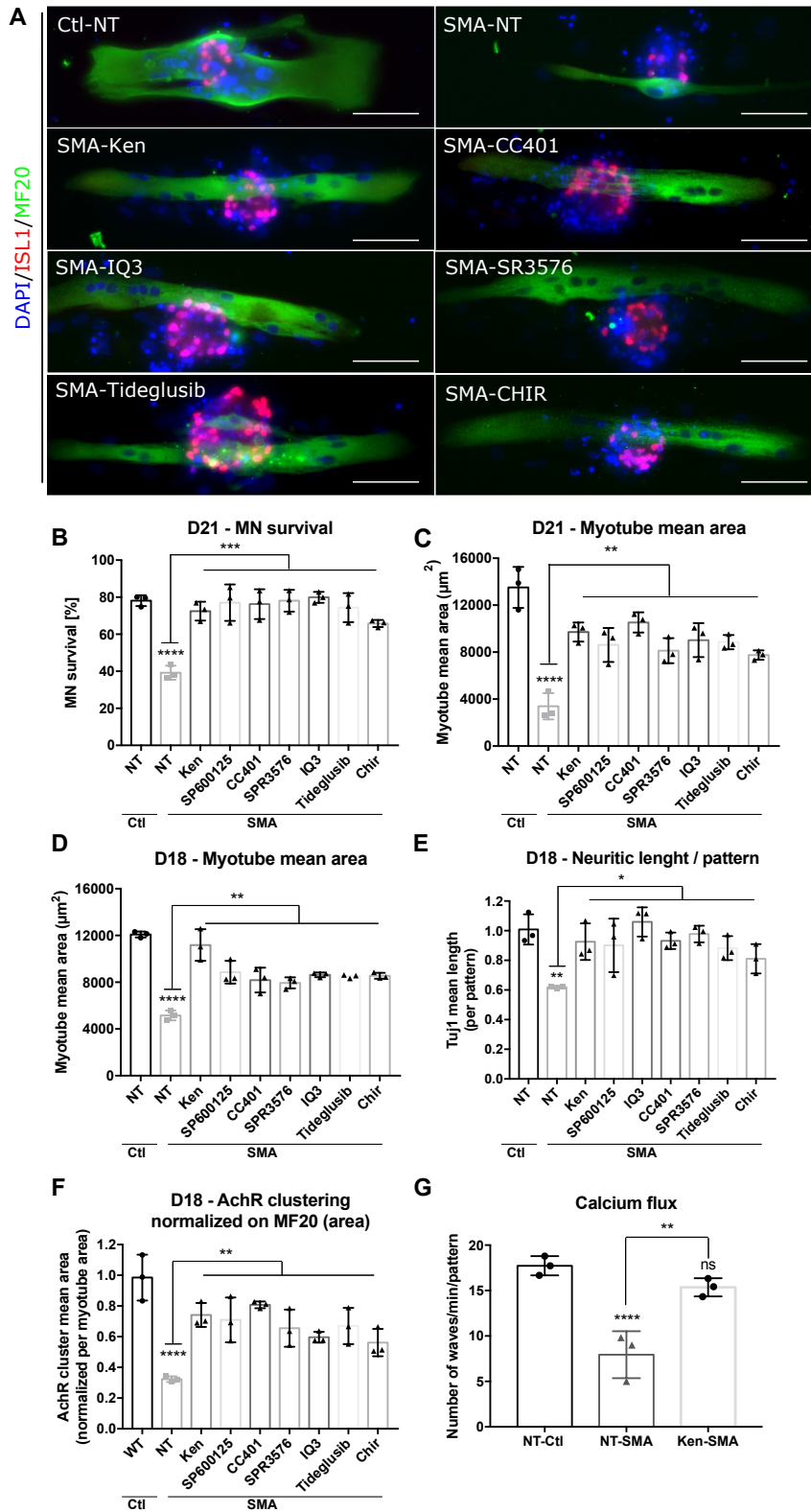
**Figure 7**



**Figure 7: Functional defects observed in the human SMA *in vitro* co-culture model. A,B.** Co-immunostaining of axonal terminal branched (Tuj1) in white with AchR and synaptic vesicles markers: Synaptic vesicle glycoprotein 2 (SV2) (A) or Synaptophysin (SYP) (B) in control condition. Scale bar: 100  $\mu$ m. **C.** Representative images of AchR (red), MF20 (green) and Tuj1 (white) on day 18 in control, SMA, rescue and hybrid co-cultures. Scale bar: 100  $\mu$ m. **D.** Quantification of Tuj1 mean length per pattern on day 18 in control, SMA, rescue and hybrid co-cultures. **E.** Quantification of AchR clusters mean area normalized on myotube area per pattern on day 18 in control, SMA, rescue and hybrid co-cultures. **F.** Quantification of the number of calcium waves recorded in human primary skeletal muscle cells per pattern and per min. **G,H.** Representative diagram of calcium waves recorded in different hiPSC-derived MN conditions (control, SMA or rescue) co-cultured with either control (G) or SMA (H) human primary skeletal muscle cells.  $\Delta F/F_0$  is the representation after background correction. Data represent the mean values  $\pm$  SD from 3 independent experiments perform on 2 control, 2 SMA and 1 rescue hiPSC-derived MN lines co-cultured with 1 control or 1 SMA primary skeletal muscle cells. Statistics were calculated using the One-Way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test ( $p > 0.05$ , ns: not significant,  $*p \leq 0.05$ ,  $**p \leq 0.01$ ,  $***p \leq 0.001$ ,  $****p \leq 0.0001$ ).



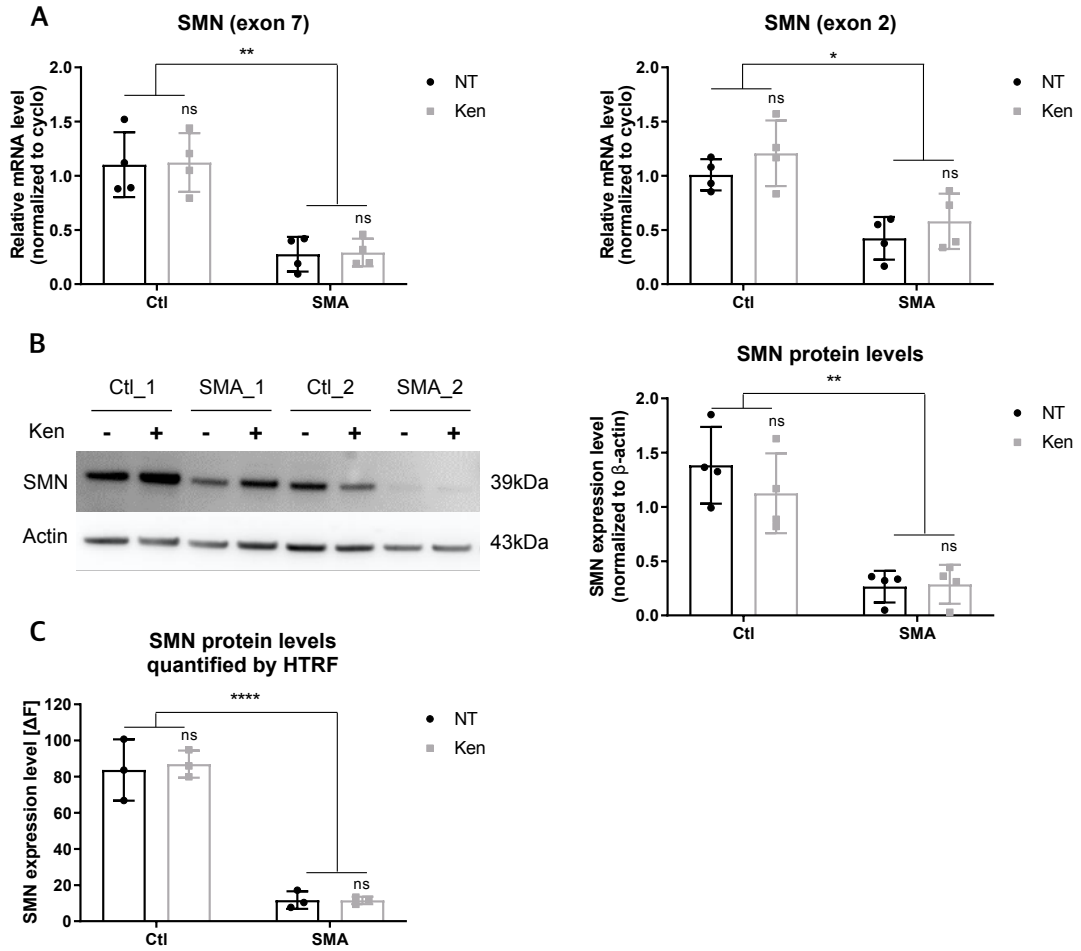
Figure 8



**Figure 8: JNK and GSK3 inhibition leads to reduce spinal MN loss and increase myotube fiber size in SMA co-culture model.** **A.** Immunostaining of ISL1 (red) MN marker and MF20 (green) myotube marker in control or SMA co-cultures untreated or treated with kenpaullone, or specific JNK inhibitor compounds (SR3576, CC401, IQ3) for 7 days. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ . **B,C.** Quantification of MNs survival (B) and myotube mean area per pattern (C) on MN day 21 in control or SMA co-cultures treated or not. **D-F.** Quantification of myotube mean area per pattern (D), AchR clusters mean area normalized on myotube area per pattern (E) and Tuj1 mean length per pattern (F) on MN day 18 in control or SMA co-cultures treated or not. **G.** Representative diagram of calcium waves recorded in control or SMA human primary skeletal muscle cells with different hiPSC-derived MN conditions (control, SMA or rescue) treated or not with kenpaullone.  $\Delta F/F_0$  is the representation after background correction. Data represent the mean values  $\pm$  SD from 3 independent experiments perform on 1 control and 1 SMA hiPSC-derived MN lines co-cultured with 1 control and 1 SMA skeletal muscle cell lines with 3 replicates per conditions.

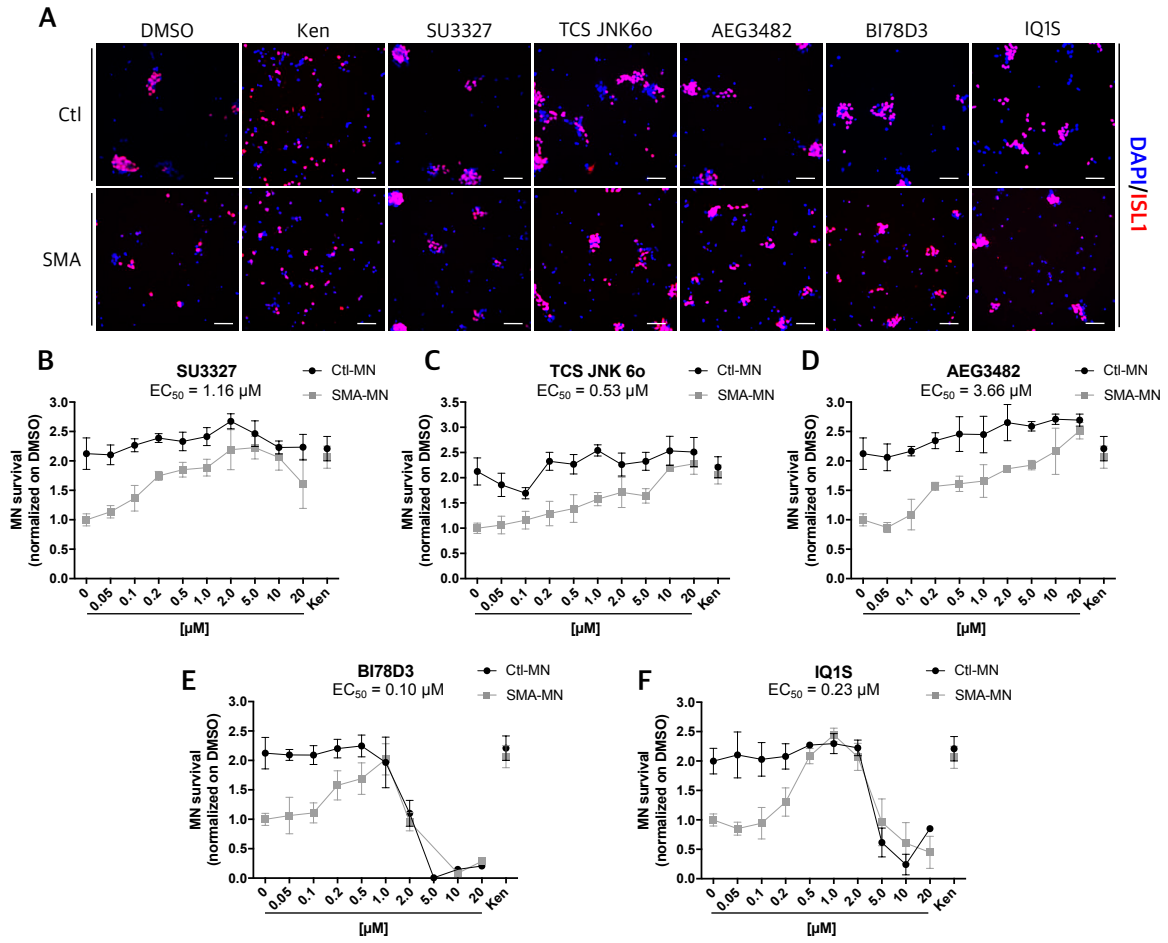
# SUPPLEMENTARY FIGURES

**Figure S1**



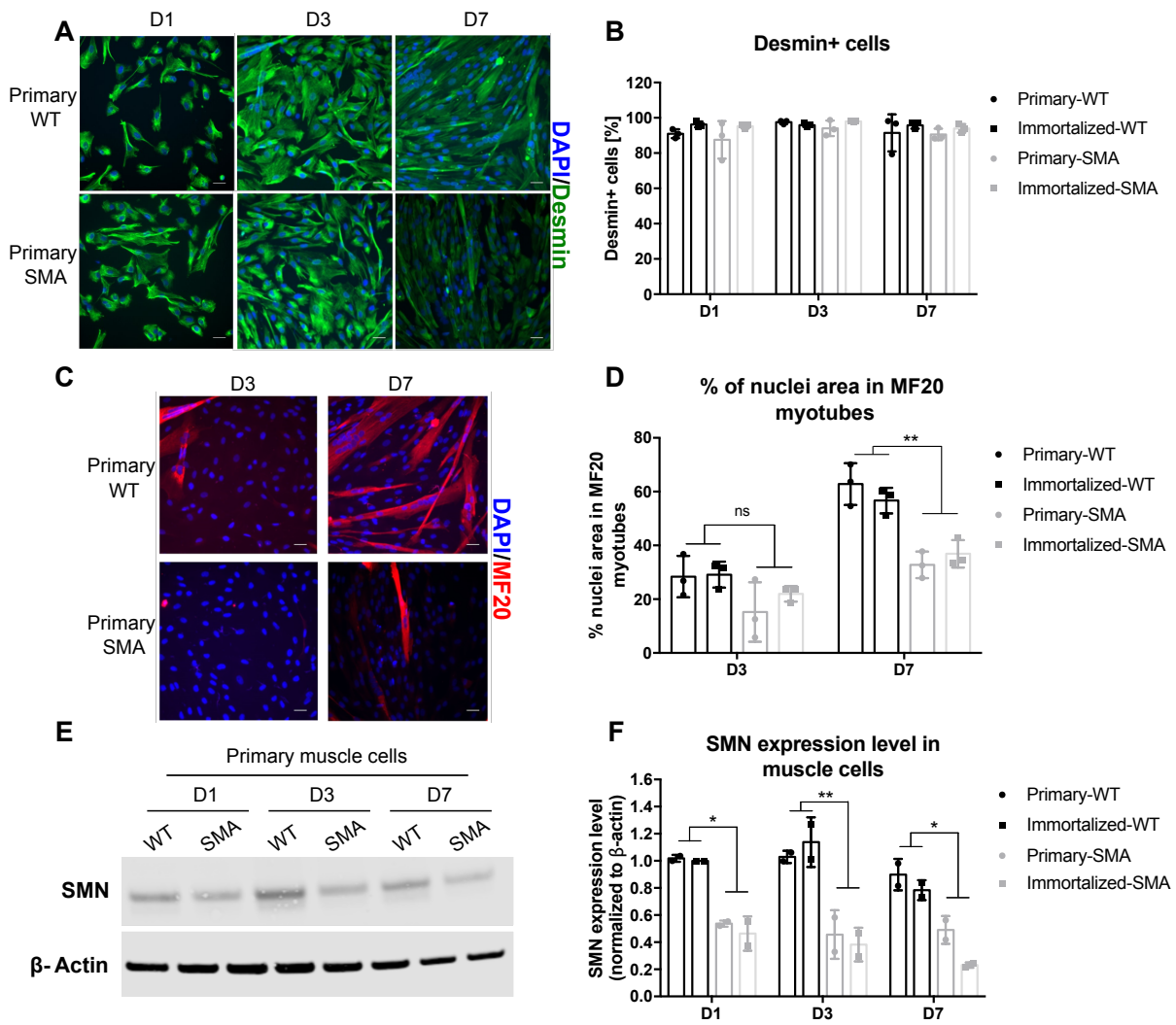
**Figure S1: Kenpaullone promotes SMA MN survival through SMN independent manner.** **A.** Relative expression level of SMN exon 7 (A) and exon 2 (B) in control and SMA hiPSC-derived MNs after Kenpaullone treatment. **B.** Western blot analysis of SMN protein expression in control and SMA MNs after Kenpaullone treatment.  $\beta$ -Actin was used as a housekeeping protein for normalization. **C.** HTRF analysis of the SMN protein level after 10 days of continuous treatment with or without kenpaullone in control and SMA hiPSC-derived MNs. Data represent the mean values  $\pm$  SD from 3 independent experiments in triplicate. Statistics were calculated using an ordinary One-Way ANOVA, Turkey's multiple comparisons test ( $p > 0.05$ , ns: not significant, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

**Figure S2**



**Figure S2: Screening of other specific JNK inhibitor compounds. A-F.** Evaluation of 5 other JNK inhibitor compounds' dose-response activity on control and SMA MN survival using a combination of DAPI and ISL1 staining at day 24 normalized on day 14 of differentiation. Kenpaullone (10  $\mu$ M) was used as a positive control. Data represent the mean values  $\pm$  SD from at least 2 independent experiments performed on 1 control and 1 SMA hiPSC-derived MN lines, with 4 technical replicates per plate.

**Figure S3**

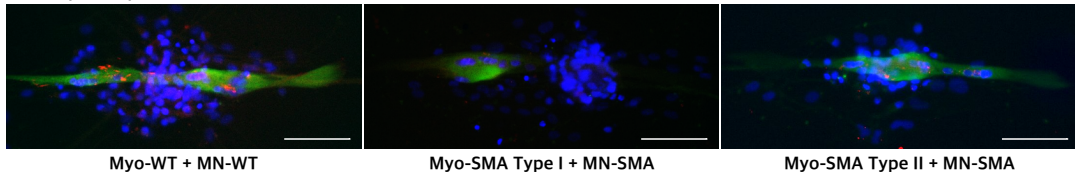


**Figure S3: Depletion of SMN protein impairs myogenic fusion in primary and immortalized cells from SMA patients.** **A.** Representative images of immunolabeling for Desmin (green) and DAPI nuclear staining (blue) in primary skeletal muscle cells from control and SMA patients on day 1, 3 and 7. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ . **B.** Quantification of Desmin positive cells in control and SMA primary and immortalized skeletal muscle cells. **C.** Immunostaining of Myosin Heavy Chain (MF20) (red) and DAPI (blue) in primary skeletal muscle cells from control and SMA patients on day 3 and 7. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ . **D.** The graph represents the area of MF20 positive nuclei normalized to the area of total nuclei measured in control and SMA primary and immortalized skeletal muscle cells. **E.** Representative example of western blot analysis for SMN at different time points of the myogenic differentiation in primary skeletal muscle cells from control and SMA patients. **F.** The graph represents the quantification of SMN protein expression level in control and SMA primary and immortalized skeletal muscle cells.  $\beta$ -Actin was used as a housekeeping protein for normalization. Data represent mean values  $\pm$  SD from 3 independent experiments. Data were analyzed with an ordinary One-Way ANOVA, Turkey's multiple comparisons test ( $p > 0.05$ , ns: not significant,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ).

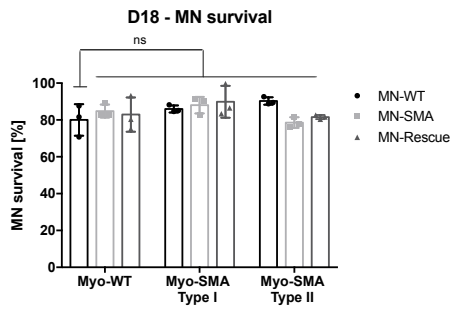


**Figure S4**

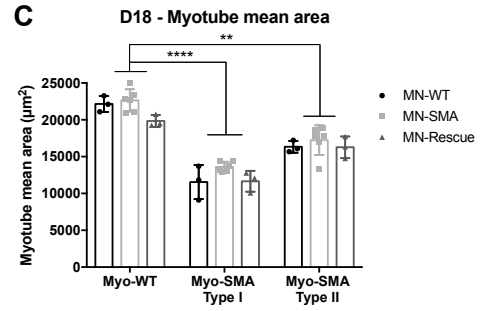
**A** DAPI/MF20/AchR



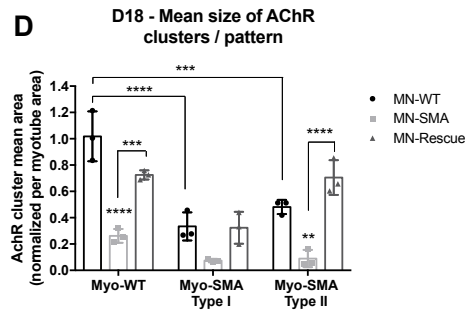
**B**



**C**



**D**



**Figure S4: Synaptic defects observed in human SMA *in vitro* co-culture model using immortalized skeletal muscle cells.** **A.** Representative images of AchR (red) and MF20 (green) in control or SMA co-cultures corresponding to MN day 18. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ . **B,C,D.** Quantification of MNs survival (B), myotube mean area per pattern (C) and AChR clusters mean area normalized on myotube area per pattern (D) in hiPSC-derived MNs control, SMA, or rescue co-cultured with control, SMA type I or SMA type II human immortalized skeletal muscle cells. Data represent the mean values  $\pm$  SD from 3 independent experiments performed on 1 control, 2 SMA and 1 rescue hiPSC-derived MN lines co-cultured with 1 control and 2 SMA immortalized skeletal muscle cells (SMA type 1 and SMA type 2) with 3 replicates per conditions. Statistics were calculated using One-Way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test ( $p > 0.05$ , ns: not significant,  $**p \leq 0.01$ ,  $***p \leq 0.001$ ,  $****p \leq 0.0001$ ).

## **SUPPLEMENTARY MATERIAL & METHOD**

Fibroblast number	Sex	Age	Type
C03	Female	57 Yr	Control
GM03814	Female	Mother of GM03813	Control
GM03813	Male	3 Yr	SMA I
GM00232	Male	7 MO	SMA I

**Table S1: Characteristics of human fibroblast-derived iPSC lines from non-affected and SMA affected patients.**

Antibody	Host	Reference	Provider	Diilution
Olig2	Rabbit	AB9610	Merck Millipore	1:500
Islet1	Goat	GT15051	Neuromics	1:1 000
Hb9	Mouse	81.5C10	DSHB	1:500
ChAT	Goat	AB144P	Merck Millipore	1:50
Tubulin $\beta$ III (Tuj1)	Mouse	801201	Biolegend	1:1 000
Tubulin $\beta$ III (Tuj1)	Rabbit	PRB-435P	Biolegend	1:1 000
Cleaved-caspase-3	Rabbit	9661S	Cell Signaling	1:400
p-c-Jun (Ser73)	Rabbit	3270S	Cell Signaling	1:800
Myosin Heavy Chain (MF20)	Mouse	MF20	DSHB	1:200
Desmin	Goat	AF3844	R&D systems	1:200
Acetylcholine receptor (AChR)	Rat	mAB 35	DSHB	1:350
SV2	Mouse	SV2	DSHB	1:50
Synaptophysin	Rabbit	PA11043	Thermo Fisher Scientific	1:200

**Table S2: List of primary antibodies, providers, and dilutions**

**Table S2: Selected GSK3 or JNK inhibitor compounds.**

Name	JNK1	JNK2	JNK3	JNK	Others	Clinical trial	References
Kenpaullone				+	CDKs; GSK3 $\beta$	Poor solubility and potency	Hazlitt et al (2018)
TCS JNK 60				+	ERK2; p38	In vitro study	Szczepankiewicz et al (2006); Kauskot et al (2007)
BI78D3				+	ERK2	In vitro study	Kaoud et al (2019); Stebbins et al (2008)
CC401				+	-	Phase I stage	Zhang et al (2015)
SU3327				+	p38; MAPK; Akt	In vitro; In vivo study	De et al (2009)
AEG3482				+	-	In vitro study	Salehi et al (2006)
SP600125	+++	+++	++		TrkA; FLT3	Preclinical	Messoussi et al (2014); Jiang et al (2019)
IQ1S	+	++	+++		-	In vitro; In vivo study	Atochin et al (2016); Schepetkin et al (2012)
IQ 3	+	+	+++		TNF $\alpha$ , NF- $\kappa$ B	In vitro; In vivo study	Schepetkin et al (2012)
SR3576			+++		p38	In vitro; In vivo study	Kamenecka et al (2009)
Tideglusib					GSK-3 $\beta$	Phase III stage (NCT03692312)	Anagnostou et al (2018); Horrigan et al (2020)
CHIR99021					GSK3	In vitro; In vivo study	

**Table S3: Selected JNK inhibitor compounds.**

## REFERENCES

- Akiba, Yosuke, Akiko Mizuta, Yoshito Kakihara, Juri Nakata, Jun Nihara, Isao Saito, Hiroshi Egusa, and Makio Saeki. 2016. "The Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases and GSK-3 $\beta$  Enhance Osteoclastogenesis." *Biochemistry and Biophysics Reports* 5 (March): 253–58. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.12.011>.
- Al-Zaidy, Samiah A., and Jerry R. Mendell. 2019. "From Clinical Trials to Clinical Practice: Practical Considerations for Gene Replacement Therapy in SMA Type 1." *Pediatric Neurology* 100 (November): 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2019.06.007>.
- Bode, Ann M., and Zigang Dong. 2007. "The Functional Contrariety of JNK." *Molecular Carcinogenesis* 46 (8): 591–98. <https://doi.org/10.1002/mc.20348>.
- Bowerman, Melissa, Catherina G. Becker, Rafael J. Yáñez-Muñoz, Ke Ning, Matthew J. A. Wood, Thomas H. Gillingwater, Kevin Talbot, and The UK SMA Research Consortium. 2017. "Therapeutic Strategies for Spinal Muscular Atrophy: SMN and Beyond." *Disease Models & Mechanisms* 10 (8): 943–54. <https://doi.org/10.1242/dmm.030148>.
- Braun, S., J.M. Warter, P. Poindron, B. Croizat, and M.C. Lagrange. 1995. "Constitutive Muscular Abnormalities in Culture in Spinal Muscular Atrophy." *The Lancet* 345 (8951): 694–95. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)90869-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)90869-2).
- Burghes, Arthur H. M., and Christine E. Beattie. 2009. "Spinal Muscular Atrophy: Why Do Low Levels of Survival Motor Neuron Protein Make Motor Neurons Sick?" *Nature Reviews. Neuroscience* 10 (8): 597–609. <https://doi.org/10.1038/nrn2670>.
- Butchbach, Matthew E. R. 2016. "Copy Number Variations in the Survival Motor Neuron Genes: Implications for Spinal Muscular Atrophy and Other Neurodegenerative Diseases." *Frontiers in Molecular Biosciences* 3: 7. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00007>.
- Castelo-Branco, Gonçalo, Nina Rawal, and Ernest Arenas. 2004. "GSK-3 $\beta$  Inhibition/Beta-Catenin Stabilization in Ventral Midbrain Precursors Increases Differentiation into Dopamine Neurons." *Journal of Cell Science* 117 (Pt 24): 5731–37. <https://doi.org/10.1242/jcs.01505>.
- Chaouch, Soraya, Vincent Mouly, Aurélie Goyenvallé, Adeline Vulin, Kamel Mamchaoui, Elisa Negroni, James Di Santo, et al. 2009. "Immortalized Skin Fibroblasts Expressing Conditional MyoD as a Renewable and Reliable Source of Converted Human Muscle Cells to Assess Therapeutic Strategies for Muscular Dystrophies: Validation of an Exon-Skipping Approach to Restore Dystrophin in Duchenne Muscular Dystrophy Cells." *Human Gene Therapy* 20 (7): 784–90. <https://doi.org/10.1089/hum.2008.163>.
- Corti, S., M. Nizzardo, C. Simone, M. Falcone, M. Nardini, D. Ronchi, C. Donadoni, et al. 2012. "Genetic Correction of Human Induced Pluripotent Stem Cells from Patients with Spinal Muscular Atrophy." *Science Translational Medicine* 4 (165): 165ra162-165ra162. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004108>.
- Ebert, Allison D., Junying Yu, Ferrill F. Rose, Virginia B. Mattis, Christian L. Lorson, James A. Thomson, and Clive N. Svendsen. 2009. "Induced Pluripotent Stem Cells from a Spinal Muscular Atrophy Patient." *Nature* 457 (7227): 277–80. <https://doi.org/10.1038/nature07677>.
- Edom, F., V. Mouly, J. P. Barbet, M. Y. Fiszman, and G. S. Butler-Browne. 1994. "Clones of Human Satellite Cells Can Express in Vitro Both Fast and Slow Myosin Heavy Chains." *Developmental Biology* 164 (1): 219–29. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1193>.
- Feng, Zhihua, Karen K. Y. Ling, Xin Zhao, Chunyi Zhou, Gary Karp, Ellen M. Welch, Nikolai Naryshkin, et al. 2016. "Pharmacologically Induced Mouse Model of Adult Spinal Muscular Atrophy to Evaluate Effectiveness of Therapeutics after Disease Onset." *Human Molecular Genetics* 25 (5): 964–75. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv629>.
- Foust, Kevin D, Xueyong Wang, Vicki L McGovern, Lyndsey Braun, Adam K Bevan, Amanda M Haidet, Thanh T Le, et al. 2010. "Rescue of the Spinal Muscular Atrophy Phenotype in a Mouse Model by Early Postnatal Delivery of SMN." *Nature Biotechnology* 28 (3): 271–74. <https://doi.org/10.1038/nbt.1610>.
- Garcera, A., N. Bahi, A. Periyakarupiah, S. Arumugam, and R. M. Soler. 2013. "Survival Motor Neuron Protein Reduction Deregulates Autophagy in Spinal Cord Motoneurons in Vitro." *Cell Death & Disease* 4 (June): e686. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.209>.

- Genabai, Naresh K., Saif Ahmad, Zhanying Zhang, Xiaoting Jiang, Cynthia A. Gabaldon, and Laxman Gangwani. 2015. "Genetic Inhibition of JNK3 Ameliorates Spinal Muscular Atrophy." *Human Molecular Genetics*, September, ddv401. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv401>.
- Gidaro, Teresa, and Laurent Servais. 2019. "Nusinersen Treatment of Spinal Muscular Atrophy: Current Knowledge and Existing Gaps." *Developmental Medicine & Child Neurology* 61 (1): 19–24. <https://doi.org/10.1111/dmcn.14027>.
- Hellbach, Nicole, Suzanne Peterson, Daniel Haehnke, Aditi Shankar, Samuel LaBarge, Cullen Pivaroff, Stefanie Saenger, et al. 2018. "Impaired Myogenic Development, Differentiation and Function in HESC-Derived SMA Myoblasts and Myotubes." Edited by Thomas H. Gillingwater. *PLOS ONE* 13 (10): e0205589. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205589>.
- Hua, Y., K. Sahashi, G. Hung, F. Rigo, M. A. Passini, C. F. Bennett, and A. R. Krainer. 2010. "Antisense Correction of SMN2 Splicing in the CNS Rescues Necrosis in a Type III SMA Mouse Model." *Genes & Development* 24 (15): 1634–44. <https://doi.org/10.1101/gad.1941310>.
- Jiang, Xiaoting, Annapoorna Kannan, and Laxman Gangwani. 2019. "ZPR1-Dependent Neurodegeneration Is Mediated by the JNK Signaling Pathway." *Journal of Experimental Neuroscience* 13 (January): 117906951986791. <https://doi.org/10.1177/1179069519867915>.
- Kariya, Shingo, Gyu-Hwan Park, Yuka Maeno-Hikichi, Olga Leykekhman, Cathleen Lutz, Marc S. Arkovitz, Lynn T. Landmesser, and Umrao R. Monani. 2008. "Reduced SMN Protein Impairs Maturation of the Neuromuscular Junctions in Mouse Models of Spinal Muscular Atrophy." *Human Molecular Genetics* 17 (16): 2552–69. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn156>.
- Kong, L., X. Wang, D. W. Choe, M. Polley, B. G. Burnett, M. Bosch-Marce, J. W. Griffin, M. M. Rich, and C. J. Sumner. 2009. "Impaired Synaptic Vesicle Release and Immaturity of Neuromuscular Junctions in Spinal Muscular Atrophy Mice." *Journal of Neuroscience* 29 (3): 842–51. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4434-08.2009>.
- Kruzik, Anita, Damir Fetahagic, Bettina Hartlieb, Sebastian Dorn, Herwig Koppensteiner, Frank M. Horling, Friedrich Scheifflinger, Birgit M. Reipert, and Maurus de la Rosa. 2019. "Prevalence of Anti-Adeno-Associated Virus Immune Responses in International Cohorts of Healthy Donors." *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development* 14 (September): 126–33. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.05.014>.
- Lefebvre, S., L. Bürglen, S. Reboullet, O. Clermont, P. Burlet, L. Viollet, B. Benichou, C. Cruaud, P. Millasseau, and M. Zeviani. 1995. "Identification and Characterization of a Spinal Muscular Atrophy-Determining Gene." *Cell* 80 (1): 155–65. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90460-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90460-3).
- Leost, Maryse, Christiane Schultz, Andreas Link, Yong-Zhong Wu, Jacek Biernat, Eva-Maria Mandelkow, James A Bibb, et al. 2000. "Paullones Are Potent Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase-3b and Cyclin-Dependent Kinase 5/P25," 12.
- Lessard, Sarah J., Tara L. MacDonald, Prerana Pathak, Myoung Sook Han, Vernon G. Coffey, Johann Edge, Donato A. Rivas, Michael F. Hirshman, Roger J. Davis, and Laurie J. Goodyear. 2018. "JNK Regulates Muscle Remodeling via Myostatin/SMAD Inhibition." *Nature Communications* 9 (1): 3030. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05439-3>.
- Ling, K. K. Y., R. M. Gibbs, Z. Feng, and C.-P. Ko. 2012. "Severe Neuromuscular Denervation of Clinically Relevant Muscles in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy." *Human Molecular Genetics* 21 (1): 185–95. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr453>.
- Lipnick, Scott L., Denis M. Agniel, Rahul Aggarwal, Nina R. Makhortova, Samuel G. Finlayson, Alexandra Brocato, Nathan Palmer, Basil T. Darras, Isaac Kohane, and Lee L. Rubin. 2019. "Systemic Nature of Spinal Muscular Atrophy Revealed by Studying Insurance Claims." *PloS One* 14 (3): e0213680. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213680>.
- Liu, Huisheng, Jianfeng Lu, Hong Chen, Zhongwei Du, Xue-Jun Li, and Su-Chun Zhang. 2015. "Spinal Muscular Atrophy Patient-Derived Motor Neurons Exhibit Hyperexcitability." *Scientific Reports* 5 (1): 12189. <https://doi.org/10.1038/srep12189>.
- Lorson, C. L., E. Hahnen, E. J. Androphy, and B. Wirth. 1999. "A Single Nucleotide in the SMN Gene Regulates Splicing and Is Responsible for Spinal Muscular Atrophy." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (11): 6307–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6307>.
- Makarev, Eugene, Kristen Fortney, Maria Litovchenko, Karl H. Braunewell, Alex Zhavoronkov, and

- Anthony Atala. 2015. “Quantifying Signaling Pathway Activation to Monitor the Quality of Induced Pluripotent Stem Cells.” *Oncotarget* 6 (27): 23204–12. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4673>.
- Martínez-González, Loreto, Claudia Gonzalo-Consuegra, Marta Gómez-Almería, Gracia Porras, Eva de Lago, Ángeles Martín-Requero, and Ana Martínez. 2021. “Tideglusib, a Non-ATP Competitive Inhibitor of GSK-3 $\beta$  as a Drug Candidate for the Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis.” *International Journal of Molecular Sciences* 22 (16): 8975. <https://doi.org/10.3390/ijms22168975>.
- Martínez-Hernández, Rebeca, Sara Bernal, Eva Also-Rallo, Laura Alías, MaJesús Barceló, Marta Hereu, Josep E Esquerda, and Eduardo F Tizzano. 2013. “Synaptic Defects in Type I Spinal Muscular Atrophy in Human Development: Synaptic Defects in Spinal Muscular Atrophy.” *The Journal of Pathology* 229 (1): 49–61. <https://doi.org/10.1002/path.4080>.
- Maury, Yves, Julien Côme, Rebecca A. Piskorowski, Nouzha Salah-Mohellibi, Vivien Chevaleyre, Marc Peschanski, Cécile Martinat, and Stéphane Nedelec. 2015. “Combinatorial Analysis of Developmental Cues Efficiently Converts Human Pluripotent Stem Cells into Multiple Neuronal Subtypes.” *Nature Biotechnology* 33 (1): 89–96. <https://doi.org/10.1038/nbt.3049>.
- Meijer, L, M Flajolet, and P Greengard. 2004. “Pharmacological Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase 3.” *Trends in Pharmacological Sciences* 25 (9): 471–80. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.07.006>.
- Mérien, Antoine, Julie Tahraoui-Bories, Michel Cailleret, Jean-Baptiste Dupont, Céline Leteur, Jérôme Polentes, Alexandre Carteron, et al. 2021. “CRISPR Gene Editing in Pluripotent Stem Cells Reveals the Function of MBNL Proteins during Human in Vitro Myogenesis.” *Human Molecular Genetics*, July, ddab218. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddab218>.
- Monani, U. R., C. L. Lorson, D. W. Parsons, T. W. Prior, E. J. Androphy, A. H. Burghes, and J. D. McPherson. 1999. “A Single Nucleotide Difference That Alters Splicing Patterns Distinguishes the SMA Gene SMN1 from the Copy Gene SMN2.” *Human Molecular Genetics* 8 (7): 1177–83. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.7.1177>.
- Monani, U. R., M. Sendtner, D. D. Covert, D. W. Parsons, C. Andreassi, T. T. Le, S. Jablonka, et al. 2000. “The Human Centromeric Survival Motor Neuron Gene (SMN2) Rescues Embryonic Lethality in *Smn*( $-/-$ ) Mice and Results in a Mouse with Spinal Muscular Atrophy.” *Human Molecular Genetics* 9 (3): 333–39. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.3.333>.
- Morales-García, Jose A., Rosario Luna-Medina, Sandra Alonso-Gil, Marina Sanz-SanCristobal, Valle Palomo, Carmen Gil, Angel Santos, Ana Martínez, and Ana Perez-Castillo. 2012. “Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibition Promotes Adult Hippocampal Neurogenesis in Vitro and in Vivo.” *ACS Chemical Neuroscience* 3 (11): 963–71. <https://doi.org/10.1021/cn300110c>.
- Murdocca, Michela, Silvia Anna Ciafrè, Paola Spitalieri, Rosa Valentina Talarico, Massimo Sanchez, Giuseppe Novelli, and Federica Sangiuolo. 2016. “SMA Human iPSC-Derived Motor Neurons Show Perturbed Differentiation and Reduced MiR-335-5p Expression.” *International Journal of Molecular Sciences* 17 (8). <https://doi.org/10.3390/ijms17081231>.
- Murray, Lyndsay M., Ariane Beauvais, Sabrina Gibeault, Natalie L. Courtney, and Rashmi Kothary. 2015. “Transcriptional Profiling of Differentially Vulnerable Motor Neurons at Pre-Symptomatic Stage in the *Smn* 2b/ $-$  Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy.” *Acta Neuropathologica Communications* 3 (1): 55. <https://doi.org/10.1186/s40478-015-0231-1>.
- Murray, Lyndsay M., Laura H. Comley, Derek Thomson, Nick Parkinson, Kevin Talbot, and Thomas H. Gillingwater. 2008. “Selective Vulnerability of Motor Neurons and Dissociation of Pre- and Post-Synaptic Pathology at the Neuromuscular Junction in Mouse Models of Spinal Muscular Atrophy.” *Human Molecular Genetics* 17 (7): 949–62. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm367>.
- Murray, Lyndsay M., Sheena Lee, Dirk Bäumer, Simon H. Parson, Kevin Talbot, and Thomas H. Gillingwater. 2010. “Pre-Symptomatic Development of Lower Motor Neuron Connectivity in a Mouse Model of Severe Spinal Muscular Atrophy.” *Human Molecular Genetics* 19 (3): 420–33. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp506>.
- Naryshkin, Nikolai A., Marla Weetall, Amal Dakka, Jana Narasimhan, Xin Zhao, Zhihua Feng, Karen K. Y. Ling, et al. 2014. “Motor Neuron Disease. SMN2 Splicing Modifiers Improve Motor Function and Longevity in Mice with Spinal Muscular Atrophy.” *Science (New York, N.Y.)* 345 (6197): 688–93. <https://doi.org/10.1126/science.1250127>.

- Palomo, Valle, Daniel I. Perez, Carlos Roca, Cara Anderson, Natalia Rodríguez-Muela, Concepción Perez, Jose A. Morales-Garcia, et al. 2017. “Subtly Modulating Glycogen Synthase Kinase 3  $\beta$ : Allosteric Inhibitor Development and Their Potential for the Treatment of Chronic Diseases.” *Journal of Medicinal Chemistry* 60 (12): 4983–5001. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00395>.
- Passini, Marco A., Jie Bu, Amy M. Richards, Cathrine Kinnecom, S. Pablo Sardi, Lisa M. Stanek, Yimin Hua, et al. 2011. “Antisense Oligonucleotides Delivered to the Mouse CNS Ameliorate Symptoms of Severe Spinal Muscular Atrophy.” *Science Translational Medicine* 3 (72): 72ra18. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001777>.
- Pilato, Celeste M, Jae Hong Park, Lingling Kong, Constantin d’Ydewalle, David Valdivia, Karen S Chen, Irene Griswold-Prenner, and Charlotte J Sumner. 2019. “Motor Neuron Loss in SMA Is Not Associated with Somal Stress-Activated JNK/c-Jun Signaling.” *Human Molecular Genetics* 28 (19): 3282–92. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz150>.
- Porensky, Paul N., Chalermchai Mitrpant, Vicki L. McGovern, Adam K. Bevan, Kevin D. Foust, Brain K. Kaspar, Stephen D. Wilton, and Arthur H. M. Burghes. 2012. “A Single Administration of Morpholino Antisense Oligomer Rescues Spinal Muscular Atrophy in Mouse.” *Human Molecular Genetics* 21 (7): 1625–38. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr600>.
- Pourtoy-Brasselet, Sandra, Axel Sciauvaud, Maria-Gabriela Boza-Moran, Michel Cailleret, Margot Jarrige, Hélène Polvèche, Jérôme Polentes, et al. 2021. “Human iPSC-Derived Neurons Reveal Early Developmental Alteration of Neurite Outgrowth in the Late-Occurring Neurodegenerative Wolfram Syndrome.” *The American Journal of Human Genetics* 108 (11): 2171–85. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.10.001>.
- Prior, Thomas W., Adrian R. Krainer, Yimin Hua, Kathryn J. Swoboda, Pamela C. Snyder, Scott J. Bridgeman, Arthur H. M. Burghes, and John T. Kissel. 2009. “A Positive Modifier of Spinal Muscular Atrophy in the SMN2 Gene.” *American Journal of Human Genetics* 85 (3): 408–13. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.08.002>.
- Ravi, Bhavya, Michelle Harran Chan-Cortés, and Charlotte J. Sumner. 2021. “Gene-Targeting Therapeutics for Neurological Disease: Lessons Learned from Spinal Muscular Atrophy.” *Annual Review of Medicine* 72 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-070119-115459>.
- Rochette, C. F., N. Gilbert, and L. R. Simard. 2001. “SMN Gene Duplication and the Emergence of the SMN2 Gene Occurred in Distinct Hominids: SMN2 Is Unique to Homo Sapiens.” *Human Genetics* 108 (3): 255–66. <https://doi.org/10.1007/s004390100473>.
- Rodrigues, N. R., N. Owen, K. Talbot, J. Ignatius, V. Dubowitz, and K. E. Davies. 1995. “Deletions in the Survival Motor Neuron Gene on 5q13 in Autosomal Recessive Spinal Muscular Atrophy.” *Human Molecular Genetics* 4 (4): 631–34. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.4.631>.
- Sabapathy, Kanaga. 2012. “Role of the JNK Pathway in Human Diseases.” *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 106: 145–69. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396456-4.00013-4>.
- Sareen, Dhruv, Allison D. Ebert, Brittany M. Heins, Jered V. McGivern, Loren Ornelas, and Clive N. Svendsen. 2012. “Inhibition of Apoptosis Blocks Human Motor Neuron Cell Death in a Stem Cell Model of Spinal Muscular Atrophy.” *PloS One* 7 (6): e39113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039113>.
- Schellino, Roberta, Marina Boido, Tiziana Borsello, and Alessandro Vercelli. 2018. “Pharmacological C-Jun NH2-Terminal Kinase (JNK) Pathway Inhibition Reduces Severity of Spinal Muscular Atrophy Disease in Mice.” *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11 (September): 308. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00308>.
- Schellino, Roberta, Marina Boido, and Alessandro Vercelli. 2019. “JNK Signaling Pathway Involvement in Spinal Cord Neuron Development and Death.” *Cells* 8 (12): 1576. <https://doi.org/10.3390/cells8121576>.
- Schmid, Aloicia, and Christine J. DiDonato. 2007. “Animal Models of Spinal Muscular Atrophy.” *Journal of Child Neurology* 22 (8): 1004–12. <https://doi.org/10.1177/0883073807305667>.
- Schrank, B., R. Götz, J. M. Gunnarsen, J. M. Ure, K. V. Toyka, A. G. Smith, and M. Sendtner. 1997. “Inactivation of the Survival Motor Neuron Gene, a Candidate Gene for Human Spinal Muscular Atrophy, Leads to Massive Cell Death in Early Mouse Embryos.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (18): 9920–25.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.94.18.9920>.
- Simon, Christian M., Ya Dai, Meaghan Van Alstyne, Charalampia Koutsoumpa, John G. Pagiazitis, Joshua I. Chalif, Xiaojian Wang, et al. 2017. “Converging Mechanisms of P53 Activation Drive Motor Neuron Degeneration in Spinal Muscular Atrophy.” *Cell Reports* 21 (13): 3767–80. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.003>.
- Suzuki, Akiko, Anne Scruggs, and Junichi Iwata. 2015. “The Temporal Specific Role of WNT/ $\beta$ -Catenin Signaling during Myogenesis.” *Journal of Nature and Science* 1 (8): e143.
- Tejero, Rocio, Stefanie Balk, Julio Franco-Espin, Jorge Ojeda, Luisa Hennlein, Hans Drexler, Benjamin Dombert, et al. 2020. “R-Roscovotine Improves Motoneuron Function in Mouse Models for Spinal Muscular Atrophy.” *IScience* 23 (2): 100826. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.100826>.
- Theeuwes, W. F., H. R. Gosker, R. C. J. Langen, K. J. P. Verhees, N. a. M. Pansters, A. M. W. J. Schols, and A. H. V. Remels. 2017. “Inactivation of Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) Enhances Skeletal Muscle Oxidative Metabolism.” *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease* 1863 (12): 3075–86. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.09.018>.
- Thompson, Luke W., Kim D. Morrison, Sally L. Shirran, Ewout J. N. Groen, Thomas H. Gillingwater, Catherine H. Botting, and Judith E. Sleeman. 2018. “Neurochondrin Interacts with the SMN Protein Suggesting a Novel Mechanism for Spinal Muscular Atrophy Pathology.” *Journal of Cell Science* 131 (8). <https://doi.org/10.1242/jcs.211482>.
- Tosolini, Andrew P., and James N. Sleight. 2017. “Motor Neuron Gene Therapy: Lessons from Spinal Muscular Atrophy for Amyotrophic Lateral Sclerosis.” *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10 (December): 405. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00405>.
- Valori, C. F., K. Ning, M. Wyles, R. J. Mead, A. J. Grierson, P. J. Shaw, and M. Azzouz. 2010. “Systemic Delivery of ScAAV9 Expressing SMN Prolongs Survival in a Model of Spinal Muscular Atrophy.” *Science Translational Medicine* 2 (35): 35ra42-35ra42. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000830>.
- Van Alstyne, Meaghan, Ivan Tattoli, Nicolas Delestrée, Yocelyn Recinos, Eileen Workman, Lamya S. Shihabuddin, Chaolin Zhang, George Z. Mentis, and Livio Pellizzoni. 2021. “Gain of Toxic Function by Long-Term AAV9-Mediated SMN Overexpression in the Sensorimotor Circuit.” *Nature Neuroscience*, April. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00827-3>.
- Wirth, B., L. Brichta, B. Schrank, H. Lochmüller, S. Blick, A. Baasner, and R. Heller. 2006. “Mildly Affected Patients with Spinal Muscular Atrophy Are Partially Protected by an Increased SMN2 Copy Number.” *Human Genetics* 119 (4): 422–28. <https://doi.org/10.1007/s00439-006-0156-7>.
- Yang, Yin M., Shailesh K. Gupta, Kevin J. Kim, Berit E. Powers, Antonio Cerqueira, Brian J. Wainger, Hien D. Ngo, et al. 2013. “A Small Molecule Screen in Stem-Cell-Derived Motor Neurons Identifies a Kinase Inhibitor as a Candidate Therapeutic for ALS.” *Cell Stem Cell* 12 (6): 713–26. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.04.003>.
- Yarza, Ramon, Silvia Vela, Maite Solas, and Maria J. Ramirez. 2015. “C-Jun N-Terminal Kinase (JNK) Signaling as a Therapeutic Target for Alzheimer’s Disease.” *Frontiers in Pharmacology* 6: 321. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00321>.
- Yoshida, Michiko, Shiho Kitaoka, Naohiro Egawa, Mayu Yamane, Ryunosuke Ikeda, Kayoko Tsukita, Naoki Amano, et al. 2015. “Modeling the Early Phenotype at the Neuromuscular Junction of Spinal Muscular Atrophy Using Patient-Derived iPSCs.” *Stem Cell Reports* 4 (4): 561–68. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.02.010>.
- Young, Joanne, Yoran Margaron, Mathieu Fernandes, Eve Duchemin-Pelletier, Joris Michaud, Mélanie Flaender, Oana Lorintiu, Sébastien Degot, and Pauline Poydenot. 2018. “MyoScreen, a High-Throughput Phenotypic Screening Platform Enabling Muscle Drug Discovery.” *SLAS DISCOVERY: Advancing the Science of Drug Discovery* 23 (8): 790–806. <https://doi.org/10.1177/2472555218761102>.
- Zhou, Haiyan, Narinder Janghra, Chalermchai Mitrpant, Rachel L. Dickinson, Karen Anthony, Loren Price, Ian C. Eperon, Stephen D. Wilton, Jennifer Morgan, and Francesco Muntoni. 2013. “A Novel Morpholino Oligomer Targeting ISS-N1 Improves Rescue of Severe Spinal Muscular Atrophy Transgenic Mice.” *Human Gene Therapy* 24 (3): 331–42. <https://doi.org/10.1089/hum.2012.211>.



## Article 2

### **Human stem cell-derived cranial and spinal motor neurons reveal transcriptional mechanisms between resistant and sensitive motor neurons in SMA**

Camille Januel<sup>1</sup>, Vincent Mouilleau<sup>1</sup>, Margot Jarrige<sup>2</sup>, Hélène Polv eche<sup>2</sup>, Céline Leteur<sup>2</sup>, Jérôme Polentes<sup>2</sup>, Stéphane Nedelec<sup>3</sup>, Marc Peschanski<sup>2</sup>, Cécile Martinat<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSERM / UEPS UMR 861, Université Paris Saclay, I-STEM, 91100 Corbeil-Essonnes, France.

<sup>2</sup> CECS/AFM, I-STEM, 91100 Corbeil-Essonnes, France.

<sup>3</sup> Sorbonne Université, INSERM, Institut du Fer à Moulin, UMR-S 1270, Paris, France.

Depuis la dernière décennie, différentes études basées sur des modèles murins SMA ont démontré un degré variable de susceptibilité à la d eg en escence de certains sous-types de motoneurones (Comley et al., 2016; Murray et al., 2015, 2008; Nichterwitz et al., 2020). Alors que les motoneurones spinaux sont le type cellulaire le plus affect e dans la maladie, certains motoneurones cr aniaux qui innervent les muscles extra-oculaires et contrôlent ainsi le mouvement des yeux par exemple semblent systématiquement résistants chez les souris SMA. Cependant, les mécanismes impliqu es dans cette sensibilité différentielle des motoneurones restent encore flous.

L'objectif principal de cette étude a consisté à évaluer la possibilité de reproduire cette vulnérabilité différentielle *in vitro* en tirant avantage de notre capacité à manipuler les cellules souches pluripotentes humaines. Pour cela, nous nous sommes bas es sur un protocole d evelopp e, il y a quelques années, par l'équipe permettant de générer les deux grandes classes de motoneurones, à savoir les spinaux et les craniaux. Cependant dans le cas de ces derniers, le protocole initialement décrit ne permettait de générer qu'environ 50 % de ces cellules ce qui ne nous paraissait pas suffisant. Nous avons donc dans un premier temps cherché à optimiser ce protocole. Pour cela, nous avons utilis e la même approche que précédemment nous permettant à la fois de jouer sur les temps d'ajout et les concentrations des molécules permettant d'agir sur les voies Wnt, Acide R etinoique et Hedgeog (Maury et al., 2015). Nos résultats ont permis de confirmer le rôle important de voie Hedgehog sur la spécification des motoneurones craniaux (Brooks et al., 2020) et ont abouti à un protocole permettant d'obtenir de façon robuste plus de 70% de motoneurones craniaux. Appliqu e à la condition SMA, nous avons ainsi pu confirmer dans un premier temps que si les motoneurones spinaux SMA ont une sensibilité accrue à la d eg en escence, médiée par un processus apoptotique, les motoneurones craniaux SMA sont quant à eux épargnés. De façon intéressante, les motoneurones craniaux SMA semblent être résistants face à la d eg en escence et ce, même à des temps plus tardifs de la différenciation. En effet, après 40

voire 60 jours de différenciation, les motoneurones craniaux SMA sont comparables aux motoneurones contrôles.

D'autre part, en se basant sur l'utilisation du système de co-culture précédemment décrit dans « l'Article 1 » (Tahraoui et al., 2022; Januel et al., 2022 - submitted), l'objectif était dans un second temps d'évaluer la communication entre ses deux principaux sous-types motoneurones et leur cible musculaire. Dans ce but, nous avons opté pour un système de co-culture hybride où des cellules musculaires squelettiques primaires contrôles ont été co-cultivées avec des motoneurones spinaux ou craniaux issus des hiPSC contrôles ou SMA. Nous avons ainsi confirmé la vulnérabilité sélective des motoneurones spinaux SMA (J21) en co-culture, phénotype qui n'est pas retrouvé dans les co-cultures en présence des motoneurones craniaux SMA. En se plaçant à des temps de co-cultures plus précoces, en particulier avant l'apparition de la dégénérescence des motoneurones spinaux SMA, nous avons identifié des défauts plus fonctionnels affectant la mise en place des clusters de récepteurs à l'acétylcholine (AChR) et l'activité calcique dans les cellules musculaires. D'une part, la quantification de l'aire des clusters de AChR a révélé une diminution significative de la taille moyenne des clusters seulement pour les co-culture en présence de motoneurones spinaux SMA. D'autre part, l'analyse de flux calcique dans les différentes conditions de co-culture a montré une diminution significative du nombre d'influx calciques au niveau post-synaptique en présence de motoneurones spinaux SMA. Aucun de ces phénotypes n'a été observé avec des neurones moteurs craniaux SMA. L'ensemble de ces résultats nous permettent de conclure que contrairement aux motoneurones spinaux SMA, les motoneurones craniaux SMA présentent une résistance à la dégénérescence et ne montrent pas non plus d'atteinte en termes de communication avec leur cible musculaire. Ainsi, la vulnérabilité sélective des motoneurones spinaux observée *in vivo* peut être reproduite dans notre modèle dérivé de hiPSC, *in vitro*.

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de cette sensibilité différentielle, nous avons dans un premier temps évalué le niveau d'expression de SMN puisque différentes études avaient suggéré que celui-ci pouvait influencer sur la survie des motoneurones (Rodriguez-Muela et al., 2017; Ruggiu et al., 2012). Ainsi, dans le but d'évaluer cette hypothèse, les ARNm des isoformes de SMN-exon 7 et SMN-total ont été quantifiés par RTqPCR et montrent une diminution significative dans les motoneurones SMA par rapport au contrôle, sans révéler de différence suivant le sous-type de motoneurones. Ces résultats ont également été confirmés au niveau protéique par immunofluorescence, western-blot et HTRF (*homogeneous time-resolved fluorescence*). Ainsi, la sensibilité différentielle des sous-types de motoneurones SMA ne peut pas être expliquée par des niveaux d'expression variables de SMN.

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes de cette dégénérescence sélective, une approche transcriptomique a été réalisée. Des analyses comparatives ont révélé des dérégulations retrouvées spécifiquement dans les motoneurones spinaux SMA. Les études d'enrichissement de ces listes de gènes ont montré que les voies principalement affectées concernaient « la projection neuronale », « la guidance axonale », « la transmission synaptique » et « le transport des vésicules synaptiques ». En recoupant nos données avec celles publiées

dans la littérature, plusieurs gènes ont retenu notre attention. Par exemple, nous avons identifié des gènes associés aux fonctions synaptiques et au maintien de la NMJ, dont plusieurs ont aussi été retrouvés dérégulés dans d'autres études transcriptomiques tels que Unc-5 Netrin Receptor A (UNC5A), Neurexin 3 (NRXN3) (Rizzo et al., 2019) et Semaphorin 6A (SEMA6A) (Welby et al., 2021). De plus, nous pouvons également confirmer la dérégulation de certains transcrits qualifiés de modificateurs et identifiés dans d'autres modèles SMA, tels que Neuritin 1 (NRN1), Plastin 3 (PLS3) et Neurocalcin Delta (NCALD) (Akten et al., 2011; Jiang et al., 2019; Oprea et al., 2008; Riessland et al., 2017; Yener et al., 2017). La neurodégénérescence dans la SMA a été largement associée à l'activation des voies apoptotiques (Gallotta et al., 2016; Murray et al., 2015; Nichterwitz et al., 2020; Rizzo et al., 2019). Nous avons également retrouvé des gènes impliqués dans la survie neuronale : contre les dommages oxydatifs (ENC1, PRDX1), les voies de signalisations apoptotique (RPH3A, BCL2) et neurotrophique (NTRK1, NTRK3, GFRA2). De façon intéressante, le gène PRDX1 a récemment été démontré comme un régulateur de la kinase JNK, médiateur de l'apoptose induite par le stress (Jeziarska-Drutel et al., 2019). La voie de signalisation JNK, que nous avons trouvée comme activée spécifiquement dans les motoneurones spinaux SMA, et qui selon plusieurs études jouerait un rôle dans la dégénérescence de la SMA dans des modèles murins (Genabai et al., 2015; Jangi et al., 2017; Schellino et al., 2019, 2018). En raison du grand nombre de gènes retrouvés dérégulés spécifiquement dans les motoneurones spinaux SMA, l'hypothèse d'un mécanisme unique sous-jacent aux différents phénotypes paraît improbable, mais l'altération combinée de plusieurs acteurs impliqués dans des voies de signalisation synaptiques, liée à la neuroprotection, la neurotransmission et la guidance axonale, pourrait être envisagée.

Pour conclure, cette étude évaluant la sensibilité différentielle des motoneurones SMA est la première basée sur un modèle *in vitro* humain. Dans l'ensemble, nos résultats confirment la sensibilité spécifique des motoneurones spinaux SMA à la fois en termes de survie et de défauts de connectivité avec leur cible musculaire squelettique. Des analyses comparatives ont permis d'identifier des dérégulations engendrées spécifiquement au niveau des motoneurones spinaux SMA. Ce modèle *in vitro* humain pourrait être appliqué à d'autres maladies neurodégénératives, comme la SLA, dans le but d'élucider les mécanismes de cette dégénérescence sélective et ainsi faciliter l'identification de nouvelles approches thérapeutiques capables de préserver les motoneurones vulnérables.

# **Human stem cell-derived cranial and spinal motor neurons reveal transcriptional mechanisms between resistant and sensitive motor neurons in SMA**

Camille Januel<sup>1</sup>, Vincent Mouilleau<sup>1</sup>, Margot Jarrige<sup>2</sup>, Hélène Polv eche<sup>2</sup>, Céline Leteur<sup>2</sup>, Jérôme Polentes<sup>2</sup>, Stéphane Nedelec<sup>3</sup>, Marc Peschanski<sup>2</sup>, Cécile Martinat<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INSERM / UEPS UMR 861, Université Paris Saclay, I-STEM, 91100 Corbeil-Essonnes, France.

<sup>2</sup> CECS/AFM, I-STEM, 91100 Corbeil-Essonnes, France.

<sup>3</sup> Sorbonne Université, INSERM, Institut du Fer   Moulin, UMR-S 1270, Paris, France.

\* Corresponding author: C. Martinat, PhD, I-Stem, 28 rue Henri Desbruères 91100 Corbeil-Essonnes France, Tel: +0033169908533, Fax: + 0033169908521, E-mail: cmartinat@istem.fr

## **ABSTRACT**

Spinal muscular atrophy is an autosomal recessive disease caused by a deficiency of the ubiquitously expressed survival of motor neuron protein. While spinal motoneurons are highly vulnerable, some motor neuron groups, including cranial motoneurons, which innervate the face and eye muscles, are spared. Understanding the mechanisms underlying this selective vulnerability is crucial to determine how the loss of a ubiquitously expressed protein can induce degeneration in a select cell type and consequently to determine new therapeutic pathways. However, progresses towards identification of such mechanisms have been hampered by the restricted access to these cellular types in humans. We took advantage of human pluripotent stem cells (hiPSC) to generate homogenous populations of spinal and cranial motoneurons. Both populations of motoneurons displayed a similar decreased SMN expression. However, SMA hiPSC-derived cranial motoneurons were found to be spared whereas SMA hiPSC-derived spinal motoneurons exhibited a defective connectivity to their muscular targets as well as a decreased survival. Comparative transcriptional analysis between resistant and vulnerable SMA motoneurons revealed the potential contribution of genes involved in neurotransmission and neurite outgrowth that may aid in the maintenance of a functional neuromuscular synapse and thus contribute to the selective resistance of certain motor neurons in SMA. Altogether, our results described the possibility to capture in vitro the selective vulnerability associated with SMA and should facilitate the identification of new therapeutic targets toward preserving vulnerable motoneurons.

**Keywords:** Spinal Muscular Atrophy, Human induced pluripotent stem cells, Cranial and Spinal motoneurons, Co-culture.

## INTRODUCTION

Spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive disease characterized by the progressive degeneration of lower  $\alpha$ -motor neurons in the anterior horn of spinal cord, resulting in denervation, skeletal muscle atrophy and in severe cases respiratory failure and death (Prior et al., 2009; Wirth et al., 2006). SMA is caused by the loss of functional survival motor neuron (SMN) protein caused by loss-of-function mutations or deletions in the *SMN1* gene (Lefebvre et al., 1995; Rodrigues et al., 1995). However, all humans comprise a second very similar gene, *SMN2*, which encodes the same SMN protein. *SMN2* differs from *SMN1* in some mutations with a translational silent cytosine to thymine transition within exon 7. This leads to an altered splicing of the vast majority of the *SMN2* pre-mRNA resulting in a shortened transcript which lacks exon 7 ( $\Delta 7$  mRNA) and only a few transcripts of the mature full length *SMN2* mRNA (Feldkötter et al., 2002; Lorson et al., 1999; Monani et al., 1999; Vitali et al., 1999; Wirth, 2000). While *SMN1* copy gives rise to the full-length (FL) SMN protein *SMN2* copy produces approximately 10% of FL-SMN transcripts. The copy number of *SMN2* can vary, making it an important phenotypic modifier, with disease severity closely correlating to the *SMN2* copy numbers.

The recent approval of three different landmark treatments which all aim at increasing the level of SMN protein has completely transformed the SMA therapeutic landscape. These treatments result in impressive benefits for the patients (Ojala et al., 2021). There is, however, a significant number of non-responders and an intervention delay has a strong negative impact on the efficacy highlighting the necessity to still better understand the pathobiology associated to SMA (Aragon-Gawinska et al., 2018; Gidaro and Servais, 2019; Kruzik et al., 2019; Pechmann et al., 2018). Currently, our understating of how loss of the widely expressed SMN leads to the selective pathogenesis observed in SMA is limited. While SMN depletion impacts first and foremost spinal cord motor neurons, it is now appreciated that certain motor neuron groups are for unknown reasons relatively resistant to degeneration (Ling et al., 2012; Murray et al., 2015, 2008; Nichterwitz et al., 2020). Among the most resistant are cranial ocular motor neurons, which control eye movement. In SMA patients ocular tracking devices are used in later stages of the disease to enable communication (Kubota et al., 2000), indicating the resistance of this group of neurons. Furthermore, neuromuscular junctions (NMJ) of spinal motor neurons present early pathological changes in mouse models of SMA while NMJ remain unaffected in extraocular muscles of end-stage SMA mice (Cifuentes-Diaz et al., 2001; Comley et al., 2016; Kariya et al., 2008; Kong et al., 2009; Murray et al., 2008; Nichterwitz et al., 2020). However, the reasons why motor neurons are selectively vulnerable to a reduction in SMN protein are currently undefined.

Investigating cell intrinsic pathways that are differentially activated within resistant and vulnerable motor neurons could reveal mechanisms of selective neuronal degeneration and lead to therapies preventing progressive motor neuron loss. Most of the transcriptomic studies in SMA have focused on the comparison of vulnerable patient-derived motor neurons (Ng et al. 2015; Rizzo et al. 2019) or whole spinal cords isolated from SMA mice SMA (Bäumer et al. 2009; Staropoli et al. 2015; Zhang et al. 2013; 2008; Maury et al., 2015) with healthy controls. These studies have revealed the importance of intrinsic factors to motor neurons for their

degeneration, but they could not explain how the loss of a ubiquitously expressed protein can induce degeneration in a select cell type. Only few studies have investigated so far transcriptional changes in differentially affected motor neuron pools (Murray et al., 2015; Nichterwitz et al., 2020). However, these studies were restricted to SMA mouse models, limiting the scope of the findings.

Here, we address this issue by taking advantage of our recent protocols to convert human pluripotent stem cells into the two fundamental classes of motor neurons, i.e. cranial and spinal motoneurons (Maury et al., 2015). When applied to SMA conditions, we demonstrated the possibility to generate an *in vitro* model recapitulating the differential vulnerability.

## RESULTS

### **Rapid and efficient hiPSC-derived protocol to study differential SMA sensitivity between cranial and spinal MNs.**

We previously demonstrated an unappreciated role for patterning molecules in specifying motor neuron diversity from hPSCs (Maury et al., 2015). Thus, manipulating the level of Wnt and Retinoic Acid (RA) signaling pathways controlled the specification of cranial and spinal motoneurons. For instance, Chir<sup>3</sup>RA<sup>100</sup> drove cells toward a spinal identity whereas lower concentrations of Chir and RA (Chir<sup>1</sup>RA<sup>10</sup>) directed cells toward a hindbrain identity that could then be differentiated into cranial MNs. Furthermore, in contrast to spinal MN differentiation protocol that generated more than 70% of spinal MNs, the cranial MN differentiation led to an average of 50% of cranial MNs.

Consequently, we first sought to optimize this initial protocol in order to obtain a higher yield of cranial MN population from these different hPSC lines. For this purpose, we evaluated time and concentration of Chir, RA and SAG (**Figure S1A and Figure 1A**). This class of MNs can be defined by the co-expression of ISL1, PHOX2B and PHOX2A markers (Nordström et al., 2006). We therefore evaluated the efficiency of the different conditions by following the number of cells expressing these markers. Neutralizing hiPSCs were exposed, in the presence of lower Wnt concentration (Chir1), to various concentrations of RA and SAG followed by DAPT. After 11 days of differentiation, while spinal MNs progenitors expressed Olig2 (75% of the cells on average), we identified a specific condition which allowed to produce a similar yield of cranial MNs progenitors expressing Nkx2.2 (**Figure S1B,C**). This condition is based on Chir<sup>1</sup>RA<sup>10</sup>SAG<sup>400</sup>. Similar results were obtained with different hiPSC lines (7 in total, including control, SMA and rescue hiPSC) (**Figure 1B-D**). ISL1, HB9 and pan-neuronal marker Tubulin  $\beta$ -III (Tuj1) expression were assessed. As expected, after 14 days of differentiation ISL1+/HB9+/PHOX2B- spinal MNs (70% of cells on average) were observed in the Chir<sup>3</sup>RA<sup>100</sup>SAG<sup>500</sup> condition from all the hiPSC lines (**Figure S1D-F and Figure 1E-J**). In contrast ISL1+/PHOX2B+/PHOX2A+/HB9- MNs were predominantly generated upon lower Wnt and RA concentrations (Chir<sup>1</sup>RA<sup>10</sup>SAG<sup>400</sup>) (**Figure S1D-F**). Thus, changing the concentration of SAG (400 nM) influenced the purity of the cranial MN population. Quantitative analyses indicated that in this condition, ISL1+PHOX2B+ neurons represented 75% of the cells on average, with no difference between control, SMA and rescue hiPSC lines (**Figure S1D,F and Figure 1E,F**). Therefore, tempering early Wnt, RA and SAG signaling

pathways led to discrete changes in cell fate and the specification of cMNs. These results demonstrated that we have generated a high proportion of bona fide spinal and cranial MNs *in vitro* that can be utilized to understand their normal function as well as resilience to degeneration in SMA diseases.

### **SMA hiPSC-derived cranial and spinal MNs have differential susceptibility to degeneration**

In order to evaluate the potential differential vulnerability of cranial and spinal MNs, we generated these two main classes of MNs from 3 control (WT), 3 SMA type 1 and 1 rescue hiPSC lines. The rescue hiPSC line corresponds to a SMA hiPSC line in which we stably reintroduced *SMN1* gene. The survival of hiPSC-derived cranial and spinal MNs, from control, SMA and rescue hiPSC lines was assessed by counting ISL1 positive cells from day 14 to day 24. While we already reported the selective vulnerability of SMA spinal MNs compared to control after 24 days of differentiation (Januel et al., 2022), we demonstrated that SMA cranial MNs are resistant with the same levels as control or rescue MNs (**Figure 2A,B**). Furthermore, by measuring the cleaved-caspase-3 (**Figure 2A,C**) and p-cJun (**Figure 2D,E**) signals, we confirmed that both of these apoptotic signals are significantly increased in SMA spinal MNs from day 18 and day 24 whereas these signals were not found dysregulated in SMA cranial MNs and even later, after 40 and 60 days of differentiation (**Figure S2A-E**). Altogether, these results demonstrated the pattern of selective motor neuron vulnerability described in SMA mice models can be reproduced *in vitro* using human pluripotent stem cells-derived neurons.

### **Transcriptional analysis of differentially vulnerable motor neurons reveals dysregulation of synaptic pathways in SMA spinal MNs**

We first sought to evaluate whether the differential vulnerability between cranial and spinal motor neurons could be related to a differential expression of SMN. SMN mRNA levels are significantly decreased in both SMA MN subtypes compared to control MNs, with no difference between cranial and spinal MNs at day 14 and day 24 (**Figure 3A,B**). These results were also confirmed at the protein level, either by immunostaining (**Figure 3C,D**), western blot analysis (**Figure 3E,F**) and homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF) assay (**Figure 3G**). Thus, the differential vulnerability between cranial and spinal motor neurons is not explained by differences in SMN expression,

To go further in understanding the molecular mechanisms that could explain the differential sensitivity of SMA hiPSC-derived cranial MNs to degeneration, we conducted a comparative transcriptomic analysis between control and SMA cranial MNs versus spinal MNs at different time point of differentiation. Thus, transcriptional analyses between differentially vulnerable motor neurons were investigated prior to the onset of degeneration (day 14) and after the appearance of degeneration (day 24). A distinct transcriptomic profile between these conditions was validated by the principal component analysis (PCA) (**Figure 4A**). The comparison between SMA hiPSC-derived cranial and spinal MNs led to the identification of 353 genes differentially expressed at day 14 and 203 genes differentially expressed at day 24 (**Figure 4B**). All the differentially expressed genes (DEGs) are listed in **Table S3**. Among the 353 DEGs observed in SMA hiPSC-derived spinal motoneurons at day 14, 144 were only found deregulated in SMA hiPSC-derived spinal motoneurons when compared to control MNs

(**Figure 4C**). Gene ontology analysis of these 144 DEGs revealed enrichment in pathway related to synaptic function “neuron projection”, “axon guidance” and “synaptic vesicle component”. Similar observations were found in the 97 DEGs specifically found deregulated in day 24 SMA spinal MNs (**Figure 4D**). Cross-checking our RNA-Seq data with data published in the literature, several genes caught our attention. Among them, different genes, associated with synaptic functions and NMJ maintenance were found to be deregulated, such as Unc-5 Netrin Receptor A (UNC5A), Neurexin 3 (NRXN3) (Rizzo et al., 2019), Semaphorin 6A (SEMA6A) (Welby et al., 2021), and glutamate ionotropic receptor AMPA-type subunit 1 and 2 (GRIA1, GRIA2), which encode core subunits of AMPA-type glutamate receptors that are critical for glutamatergic excitatory synapses (Rizzo et al., 2019; Zhang et al., 2013). We also found genes involved in the maintenance of neuronal survival through apoptotic (RPH3A, BCL2) and neurotrophic factor signaling (NTRK1, NTRK3, GFRA2). Interestingly, these genes were also identified as deregulated in other SMA models (Nichterwitz et al., 2020; Welby et al., 2021). Finally, Plastin 3 (PLS3), Neuritin 1 (NRN1) and Neurocalcin Delta (NCALD), previously described as SMA modifiers, are found deregulated specifically in SMA spinal MNs, further supporting the potential involvement of these genes in selective MN vulnerability (Akten et al., 2011; Jiang et al., 2019; Oprea et al., 2008; Riessland et al., 2017; Yener et al., 2017).

### **Communication defects between SMA iPSC-derived spinal MN and its skeletal muscle target**

To evaluate at the functional level the potential contribution of these dysregulated synaptic pathways, we next sought to analyze the capacity of spinal and cranial MNs to interact with their skeletal muscle targets.

For this purpose, we used an already published *in vitro* humanized co-culture system between hiPSC-derived MNs and human skeletal muscle cells compatible with cellular and functional analyses (Tahraoui et al., 2022; Januel et al., 2022). The use of a 384 well plate format offers the possibility for drug screening assays, as we recently demonstrated (Januel et al., 2022). In order to evaluate only the influence of the pre-synaptic compartment, different hybrid systems were developed in which control primary skeletal muscle cells were co-cultured with control or SMA hiPSC-derived cranial or spinal MNs (**Figure 5A**). As previously observed in the cultures of hiPSC-derived MNs alone, a significant decreased survival of SMA spinal MNs was quantified when compared to SMA cranial MNs (**Figure 5B,C**). This phenotype could not be attributed to a difference of myogenic area (**Figure 5D**). In parallel to the MN survival phenotype, quantitative analysis of the mean size of AChR clusters revealed impaired endplate maturation only in SMA spinal MNs condition and even before MNs cell death (day 18) as compared to SMA cranial MNs and control spinal and cranial MNs (**Figure 5E,F**).

To evaluate the functional consequences of these phenotypes, Ca<sup>2+</sup> oscillations induced hiPSC-derived spinal and cranial MNs were measured at the level of skeletal muscle cells. A significant decrease in the frequency of calcium transient was observed in the presence of SMA spinal MNs only (**Figure 6A,B**). In contrast, no difference was observed between SMA cranial MNs and WT spinal and cranial MNs. Because the muscular component consisted in healthy control skeletal muscle cells, we concluded that abnormal behavior of the myofibers could be



attributable to the presence of SMA hiPSC-derived spinal MNs.

## DISCUSSION

In this study, we described the possibility to reproduce *in vitro* the selective vulnerability of spinal motoneurons associated with SMA by using human pluripotent stem cells. While SMA cranial and spinal hiPSC-derived MNs harbored the same amount of SMN protein, only SMA hiPSC-derived spinal motoneurons exhibited defective connectivity to their muscular targets as well as decreased survival. Comparative transcriptomic analyses also revealed pathways associated with differential vulnerability. We demonstrated a selective down regulation of synaptic pathways in selectively vulnerable motor neurons observed prior to defective connectivity to their muscular targets.

SMA and other neuromuscular disorders, such as amyotrophy lateral sclerosis (ALS), present, for unknown reasons different motor neurons groups varying degrees of susceptibility to degeneration. Investigating cell intrinsic pathways that are differentially activated within resistant and vulnerable motor neurons could reveal mechanisms of selective neuronal degeneration and lead to therapies preventing progressive motor neuron loss. However, due to the difficulties to have access to suitable human material, either from biopsy or post-mortem, most of our knowledges come from initial research on animal models (Allodi et al., 2019, 2016; An et al., 2019; Comley et al., 2016; Hedlund et al., 2010; Kaplan et al., 2014; Murray et al., 2015; Nichterwitz et al., 2020; Nijssen et al., 2017). Thanks to the remarkable progress made in the recent years in the generation of hiPSC and their differentiation into specific cell types, disease-specific hiPSC offer new opportunities to explore the potential sources of differential vulnerability. Our group has previously demonstrated the potential of using human pluripotent stem cells to convert them rapidly and efficiently into homogenous and synchronous population of spinal motoneurons (Maury et al., 2015). Although this protocol demonstrated the conversion of hPSC onto cranial motoneurons, the differentiation yielded only 50% of cranial motoneurons with a proportion of contaminating non-relevant cells that clearly hampered efforts to pathological modeling. By taking advantage of our previous approach to expose hPSC to a virtually unlimited number of concentrations, durations, and combinations of small molecules, we optimized this previous protocol and identified the condition allowing us to generate high proportion of *bona fide* cranial motoneurons from different hiPSC lines. Thanks to this development, we confirmed that spinal motoneurons are selectively vulnerable to the decrease expression of SMN in contrast to cranial motoneurons. This selective vulnerability concerns both the survival of this sub-type of motoneurons but also their capacity to interact with their skeletal muscle cells prior their degeneration.

One possible mechanism underlying motoneuron differential sensitivity may reside in variation of SMN levels depending on motoneurons subtypes. Thus, it has been recently shown in motoneurons derived from mouse and human pluripotent stem cells with low SMN are more susceptible to cell death (Rodriguez-Muela et al., 2017). Together with previous evidence that spinal motoneurons display inefficient SMN2 exon 7 inclusion compared to other cells in the spinal cord (Ruggiu et al., 2012), these studies suggest that differences in the degree of SMN

reduction could contribute to the selective vulnerability of specific motor neuron pools in SMA. However, consistently with our results, a more recent study, has investigated SMN2 splicing among different sub-types of motoneurons, and showed no difference in exon 7 splicing efficiency (Nichterwitz et al., 2020). Altogether, these data warrant further investigation to identify cell intrinsic mechanisms of selective motoneuronal vulnerability in SMA.

We consequently performed a comparative transcriptomic analysis between spinal and cranial motoneurons from SMA and control hiPSC. Comparative analyses revealed the deregulation of several pathways related to the neuron projection, axon guidance and synaptic vesicle components and synapses. Interestingly, these results are concordant with previous transcriptomic analyses performed on different murine SMA models, including the deregulation of GRIA1 and GRIA2, which encode core subunits of AMPA-type glutamate receptors that are critical for glutamatergic excitatory synapses (Rizzo et al., 2019; Zhang et al., 2013). We also found genes involved in neurotransmission and neurite outgrowth that should aid in the maintenance of a functional neuromuscular synapse, with some of them already shown deregulated in SMA such as Unc-5 Netrin Receptor A (UNC5A), Neurexin 3 (NRXN3) (Rizzo et al., 2019) and Semaphorin 6A (SEMA6A) (Welby et al., 2021). Remarkably, we confirmed the deregulation of modifiers already found to be altered in other SMA models, such as Neuritin 1 (NRN1), Plastin 3 (PLS3) and Neurocalcin Delta (NCALD) (Akten et al., 2011; Jiang et al., 2019; Oprea et al., 2008; Riessland et al., 2017; Yener et al., 2017).

Neurodegeneration in SMA has been widely associated with stress and apoptotic pathways activation (Gallotta et al. 2016; Murray et al. 2015; Nichterwitz et al. 2020; Rizzo et al. 2019). We also found genes needed to maintain neuronal health against oxidative damage (ENC1, PRDX1) and through apoptotic (RPH3A, BCL2) and neurotrophic factor signaling (NTRK1, NTRK3, GFRA2). We showed here PRDX1 deregulation, interestingly this gene was recently demonstrated as a regulator of JNK kinase signaling pathway (Jeziarska-Drutel et al. 2019). JNK signaling pathway that we found as significantly upregulated specifically in our SMA hiPSC-derived spinal MNs and that was already implicated in the degeneration of SMA in mouse models (Genabai et al. 2015; Jangi et al. 2017; Schellino et al. 2019, 2018). As SMN also functions locally in the axon, including in nerve terminals, preventing apoptosis is unlikely to fully rescue motor neuron function. Due to the large number of deregulated genes, we identified, the hypothesis of a unique gene underlying the different phenotypes may be unlikely and combined misexpression of several actors involved in synaptic signaling pathways, related to neuroprotection, neurotransmission, and neurite outgrowth, might be considered.

Cell-type specificity is a hallmark of most human diseases. Combining patient-specific hiPSC and targeted differentiation into closely related cell types distinguished by their sensitivity to disease, such as different MN disorders, should facilitate *in vitro* disease modeling and drug screening. More generally, our approach should be applicable to other neuromuscular diseases such as ALS, to further elucidate mechanisms that could be highly advantageous to activate *in vivo* to rescue vulnerable motor neurons from degeneration.

## MATERIALS AND METHODS

### Human induced pluripotent stem cells

Human induced pluripotent stem cell lines (hiPSC) were generated by reprogramming Coriell Biorepository fibroblasts derived from non-affected and SMA affected patients as previously described (Maury et al. 2015). Three independent clones hiPSC were generated from each lines of healthy fibroblasts GM03814 and C03. Similarly, 3 independent clones of hiPSC were generated from each fibroblast lines issues from two type SMA type 1 patients (GM03813 or GM00232). Informed consents were obtained from all the patients included in this study, complying with the ethical guidelines of the institutions and with the legislation requirements. Experimental protocols were approved by the French minister of health (2019-A02599-48). In addition to these hiPSC lines, an isogenic control line was generated from one SMA hiPSC line (GM03813) in which a plasmid containing SMN (pEF1aFlagbiotagSMN-PGKpuro, kindly gift of H. Wichterle and S. Nedelec) was stably transfected. Briefly, cells were nucleofected with 5mg of linearized plasmid (ClaI enzyme) (AMAXA Program 23). Cells were selected for 8 days with puromycin (1µg/ml). The integration of the transgene was validated by immunostaining for the Tag and by western blot for SMN.

All the different hiPSC lines were grown on culture dishes-coated vitronectin (Gibco) and maintained in iPS-Brew XF medium (Miltenyi Biotec) as previously described (Mérien et al, 2021). Cell passaging was performed manually every 5 days and culture medium was changed every two days.

### Generation of spinal and cranial motor neurons from hiPSCs

The conversion of hiPSC into spinal or cranial MNs was performed as previously described (Maury et al. 2015). Briefly, hiPSC were dissociated enzymatically using Stem Pro Accutase (ThermoFisher) for 5 min and plated in 25cm<sup>2</sup> flask (Dutscher) at a density of 0.2x10<sup>6</sup> cell/mL in a total volume of respectively 10mL. Cells were incubated in suspension in a neural induction medium containing of DMEM/F12 and Neurobasal medium supplemented with B27 (Life Technologies), N2 Supplement (Life Technologies), Pen-Strep 0.1%, β -ME 0.1% (Life Technologies), Chir99021 (3 µM for spinal MNs and 1 µM for cranial MNs, Stemgent), SB431542 (20 µM, Tocris), LDN 193189 (0.2 µM, Stemgent) and Y-27632 (10 µM, Stemcell). After 4 days, caudalization of the neural progenitors was obtained by addition of retinoic acid (RA 100 nM for spinal MNs and 10 nM for cranial MNs) and smoothened agonist (SAG, 0.5 µM for spinal MNs and 0,4 µM for cranial MNs). After 1 week in suspension, brain derived neurotrophic factor (BDNF, 10 ng/mL), glial-derived neurotrophic factor (GDNF, 10 ng/mL), and N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S- phenylglycine t-butyl ester (DAPT, 10 nM) were added in the medium without SB431542 and LDN193189. From day 10, spinal MN progenitors can be labelled with the Olig2 marker and cranial MN progenitors with the Nkx2.2. marker. Between day 10 and 14, MN progenitors are converted into MNs. At this step (day 10) embryoid bodies (EBs) were dissociated into single cells with Trypsin-EDTA and plated either in 384-well plates (Corning) or cell culture dish coated with poly-ornithin (20 µg/ml, Sigma-Aldrich) and 5 g/ml laminin (Invitrogen) into the same medium with Y-27632. MNs were obtained after 14 days of differentiation and can be assessed by immunolabeling for both

Islet1/hb9 for spinal MN and Islet1/Phox2B/Phox2A for cranial MN.

### **Co-culture of human iPSC-derived spinal MN and human skeletal muscle cells**

Human primary myoblasts were obtained from the Myobank-AFM and provided by Vincent Mouly. Skeletal muscle cells were obtained from a quadriceps muscle biopsy of a 5 day-old unaffected infant (CHQ or Ctl) (Edom et al. 1994). Primary cells were isolated from skeletal muscle as described previously (Chaouch et al. 2009). These cells were expanded and differentiated as previously described. Briefly, primary myoblasts were expanded in a mix of 199 medium/Dulbecco modified Eagles minimal essential medium (1:4 ratio) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS), 25 µg/mL fetuin, 0.5 ng/mL basic fibroblast growth factor, 5 ng/mL epidermal growth factor, 5 µg/mL insulin. Cells were then cultivated in a growth medium consisting of DMEM-F12 glutamax (Life Technologies) supplemented with 20% FBS (Sigma-Aldrich) and 0,1% penicillin/streptomycin (Life Technologies). Myogenic differentiation was induced by switching growth medium to DMEM supplemented with 2% horse serum (Life Technologies).

For co-culture, spinal and cranial MNs must be differentiated from hiPSC as described previously, but the embryoid bodies are dissociated at day 14 of differentiation and frozen. 384 micropatterned-well plates were designed and provided by CYTOO SA (Young et al. 2018). The co-cultures were performed as previously described (Tahraoui et al., 2022 - submitted). Briefly, myoblasts were plated at a density of 5 500 cells per well in myoblast growth medium (DMEM/F12-glutamax supplemented with 20% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich) and 0.1% penicillin-streptomycin (ThermoFisher)) with Y- 27632 (10 µM, Stemcell). After 2 days, the growth medium was replaced by the differentiation medium (DMEM/F12-glutamax supplemented with 2% hors serum (ThermoFisher)). On day 4, the hiPSC-derived MNs were thawed and plated at a density of 8 000 cells per well in N2B27 medium supplemented by brain derived neurotrophic factor (BDNF, 10 ng/mL, Peprotech), glial-derived neurotrophic factor (GDNF, 10 ng/mL, Peprotech), N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S- phenylglycine t-butyl ester (DAPT, 10 µM, Tocris) and Y- 27632 (10 µM, Stemcell). Cultures have been maintained up to 11 days which correspond to 4 days of myogenic differentiation and 7 days of co-culture with hiPSC-derived MNs.

### **Immunostaining**

After fixation with 4% PFA (Electron Microscopy Sciences) for 7 min at room temperature, cells were incubated overnight at 4°C with primary antibodies (listed in **Table S1**). The, the cells were washed 3 times in PBS buffer and incubated for 1h at room temperature with appropriated Alexa fluorescent labeled secondary antibodies (Invitrogen, 1:1 000) and Hoechst (5 µg/mL).

### **Image acquisition and analysis**

Image acquisition were performed using the automated imaging Cell Insight CX7 HCS Platform (Cellomics Inc). Masks and algorithms were developed with the HCS Reader software for automated quantification of the percentage of cells stained for ISL1, Caspase-3 and p-c-Jun, compared to the total number of cells. Co-culture images were acquired using Spinning Disk microscopy (Zeiss) with 20X objective. Each image was taken with z-stack and an orthogonal

view was performed on Fiji Software. By using Fiji software, AChR clustering were quantified by manually measuring the total area as well as the mean size of AChR clusters (Tahraoui et al., 2022). Islet1 quantification was determined by automatically counting the number of Islet1-positive cells by micropattern. Myotube area was quantified by using Fiji Software to quantify total area of cells stained by MF20 antibody per micropattern.

### **Protein extraction and Immunoblotting**

Western blots analyses were performed as previously described (Pourtoy-Brasselet et al. 2021). Briefly, cells were lysed in RIPA 1X buffer (Sigma-Aldrich) supplemented with 1% protease inhibitors (Sigma-Aldrich) and 10% phosphatase inhibitor (Roche). Protein samples were quantified with Pierce BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific) with CLARIOstar Plus Instrument (BMG Labtech). Protein extracts (10 µg) were loaded on a 4-12% SDS-PAGE gradient (NuPage Bis–Tris gels, Invitrogen) and transferred onto Gel Transfer Stacks Nitrocellulose membranes (Invitrogen) using the iBlot2 Dry Blotting System (Invitrogen). Membranes were then incubated overnight at 4°C with following primary antibodies: mouse anti-SMN (610647, BD Transduction, 1:500). Following 1h incubation with the fluorescent secondary antibodies (1:10,000, Li-Cor), blots were revealed with Odyssey CLx Imaging System (Li-Cor). Equal protein loading was verified by the detection of GFAP (1:5 000, Li-Cor).

### **HTRF Assay to quantify SMN protein expression**

SMN protein was also quantified using Homogeneous Time Resolved Fluorescence (HTRF, Cisbio Bioassays) according to the manufacturer's protocol. This technology allows the detection and quantification of SMN protein in 384 well plate format. For this, cells were lysed in 15 µL of lysate buffer and 10 µL of cell lysate were transferred to a 384-well small volume white plate containing 5 µL of the antibody solution (1:100 dilution of anti-SMN d2 and anti-SMN cryptate) (Cisbio). The plate was incubated overnight at room temperature. Fluorescence was measured at 665 nm and 620 nm on a CLARIOstar microplate reader (BMG Labtech). Ratio values of (665 nm emission/620 nm emission) × 10 000 were used to calculate ΔF (%) according to the following equation:

$$\Delta F (\%) = [(\text{Sample ratio} - \text{Negative control ratio}) / \text{Negative control ratio}] \times 100.$$

### **Calcium imaging**

Cell culture medium was replaced with a Ca<sup>2+</sup>-containing HEPES buffered salt solution (Ca<sup>2+</sup>-HBSS) composed of (mM): 135 NaCl, 5.4 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, and 10 glucose; pH=7.4 set with NaOH). Cells were then incubated with 2 µM of Cal520 probe (Abcam, 1:1 000) diluted in Ca<sup>2+</sup>-HBSS. After 20 min, cells were washed twice with Ca<sup>2+</sup>-HBSS solution and kept at RT for 15 min prior to recording in controlled atmospheric Zeiss Spinning Disk Microscopy. Acquisitions were performed at 200 ms intervals. Images were processed and analyzed on Fiji Software using ROI manager to quantify fluorescence intensity inside each myotube (= 1 ROI) and corrected for background. The curve of calcium response is represented as time as function of the ΔF/F<sub>0</sub> ratio in which F<sub>0</sub> represents the basal fluorescence intensity whereas ΔF represents the mean fluorescence (Tahraoui et al., 2022 - submitted).

### **RNA isolation and RT-qPCR analysis**

Total RNAs were isolated using the RNAeasy Mini extraction kit (Qiagen) according to the manufacture's protocol. RNA level and quality were checked using the NanoDrop technology. cDNA was synthesized using SuperScript III (ThermoFisher). Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis was performed using a QuantStudio 12K Flex real-time PCR system (Applied Biosystem). Primers sequences are detailed in **Table S2**. All analyses were performed with at least three technical replicates per plate. The  $2^{-\Delta\Delta}$  Ct method was used to determine the relative expression level of each gene. All expression data were normalized to cyclophilinA and 18S housekeeping genes.

### **RNA-Seq library preparation and sequencing (TrueSeq polyA)**

Total RNAs were isolated using the RNAeasy Mini extraction kit (Qiagen) according to the manufacture's protocol. RNA level were assessed using the NanoDrop technology and quality control was evaluated by determining RNA Integrity Number (RIN) using the RNA screen tape technology (Agilent). For each sample, 100ng of total RNA was used. mRNAs were purified using poly-T oligo from TruSeq Stranded kit (Illumina) and were fragmented and retro-transcribed using the TruSeq Stranded kit following the protocol of the manufacturer (Illumina). Final library was quantified using Agilent High Sensitivity DNA kit before the samples were pooled in sets of six for sequencing. 2nM of pooled libraries were denatured and the quantity of 1.8pM was used for cluster generation before paired-end sequencing on an Illumina Nextseq550 (High output 2\*150pb run). Samples were sequenced with an average of 89 532 366 reads (paired-end) per sample. The quality control of the sequencing data was evaluated using FastQC (v0.11.2) ("Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data"). The reads were trimmed using Prinseq (v0.20.4) (Schmieder and Edwards 2011) (-trim-right 20) and filtered by average quality score (--trim-qual 20) and cutadapt (v1.16) (Martin, 2011). For the Alternative splicing the raw reads was annotated on GRCh37.75 Ensembl reference annotation by Tophat2 (Daehwan Kim et al. 2013) (v2.0.13) and analyzed using only reads on exonic junctions with FaRLINE pipeline (Benoit-Pilven et al. 2018) and FasterDB database (Mallinoud et al. 2014).

### **Statistical analysis**

All quantitative data were analyzed with Prism 8. Values are represented as  $\pm$  SD. Student's t-test was used to compare data between two groups (\*p < 0.05; \*\*p < 0.005; \*\*\*p < 0.0005; \*\*\*\*p < 0.0001). One-way analysis of variance (ANOVA) was performed to compare data among three or more groups, followed by a post-hoc Tukey's multiple comparison test. Values of p < 0.05 were considered as statistically significant (\*p < 0.05; \*\*p < 0.005; \*\*\*p < 0.0005; \*\*\*\*p < 0.0001).

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

C.J. and C.M.: conception and design. C.J. and C.M.: investigation and data collection. C.J., M.J., H.P., J.P., C.L., S.N, and C.M.: formal analysis and interpretation. C.J. and C.M.: provision of different cellular resources. C.M.: financial support. C.J. and C.M.: manuscript writing.

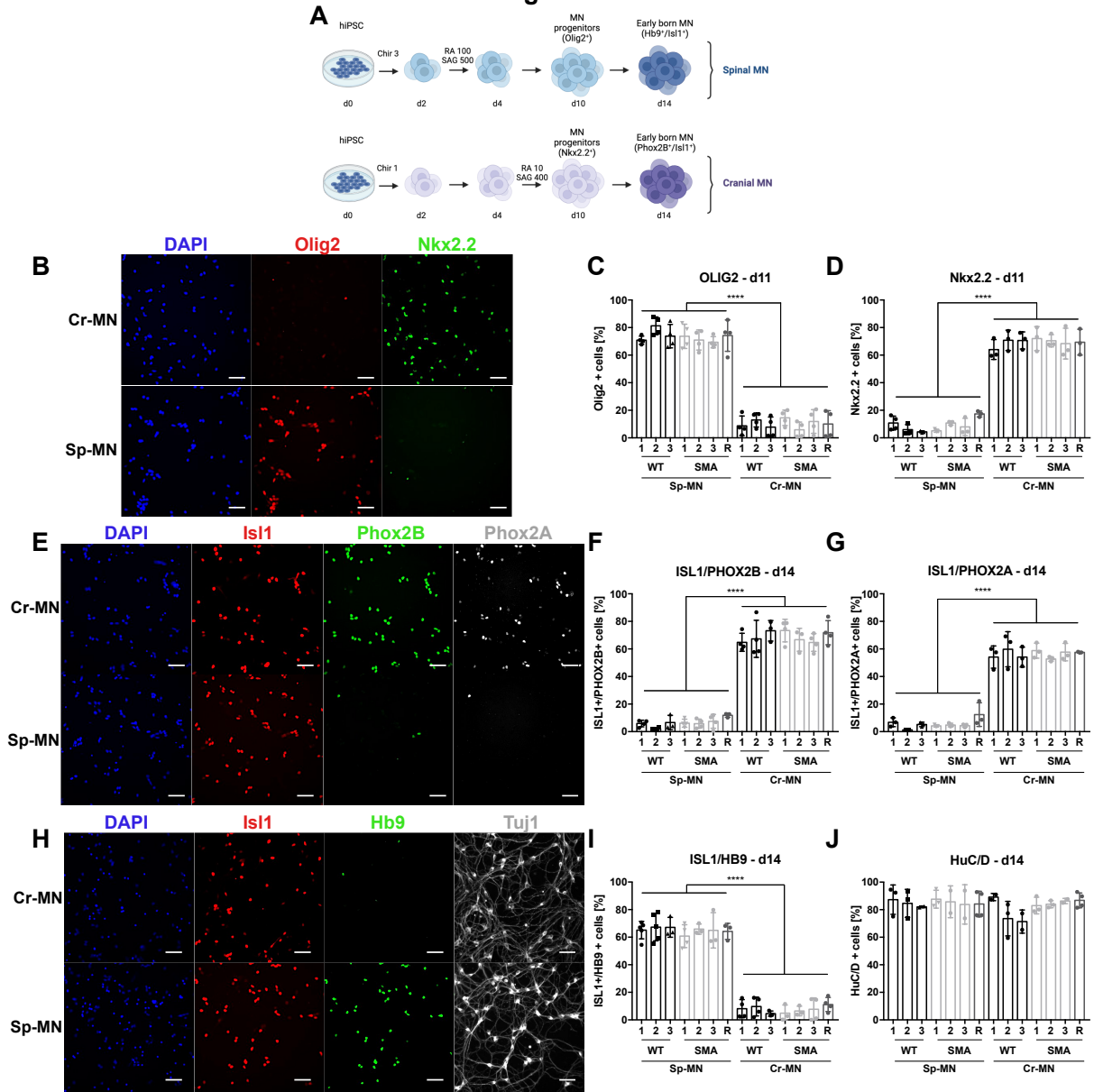
## **DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST**

The authors declare no conflicts of interest

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

I-Stem is part of the Biotherapies Institute for Rare Diseases (BIRD) supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon). This project was supported by grants from Laboratoire d'Excellence Revive (Investissement d'Avenir; ANR-10-LABX-73), the doctoral school « Innovation Thérapeutique, du fondamental à l'appliqué » (ED 569) from Paris Saclay University and Agence Nationale de la Recherche (ANR). We thank Hynek Wichterle and Stéphane Nedelec for the kindly gift of rescue hiPSC line.

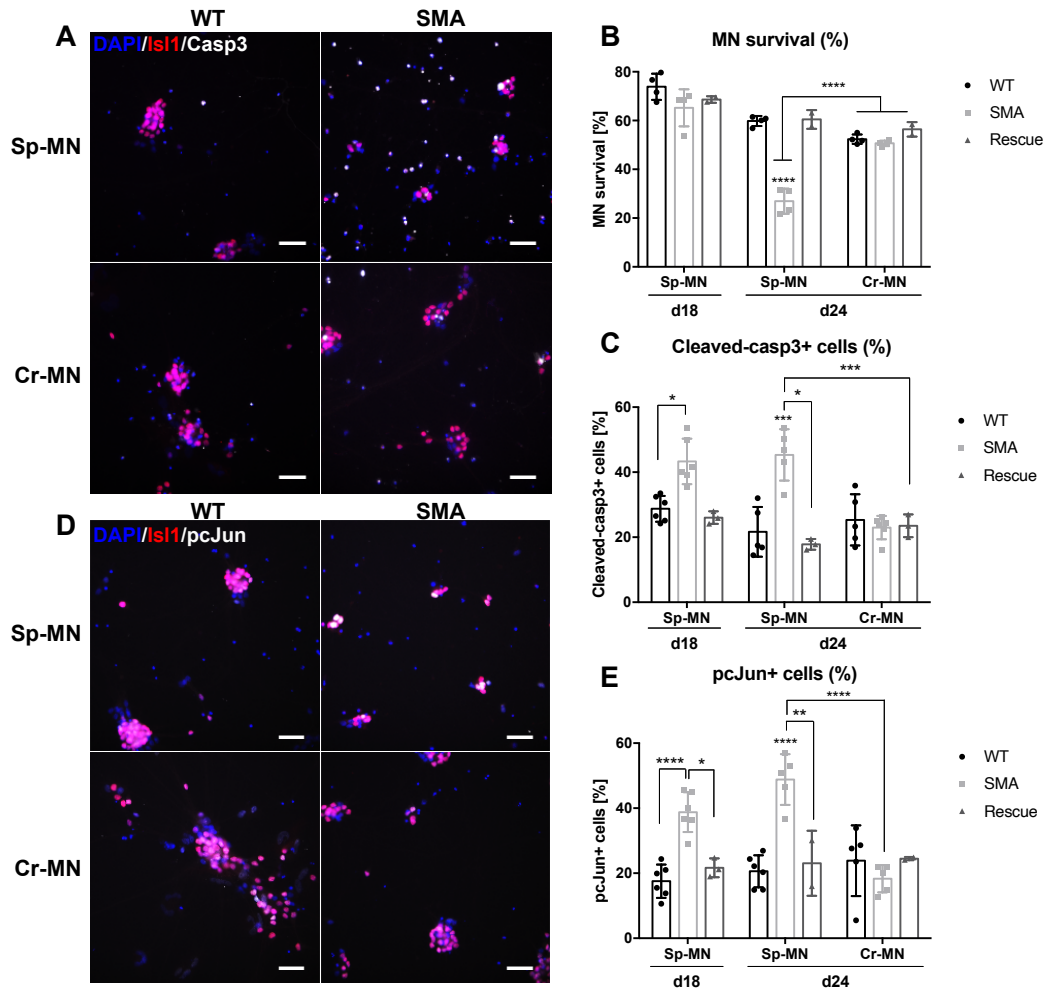
**Figure 1**





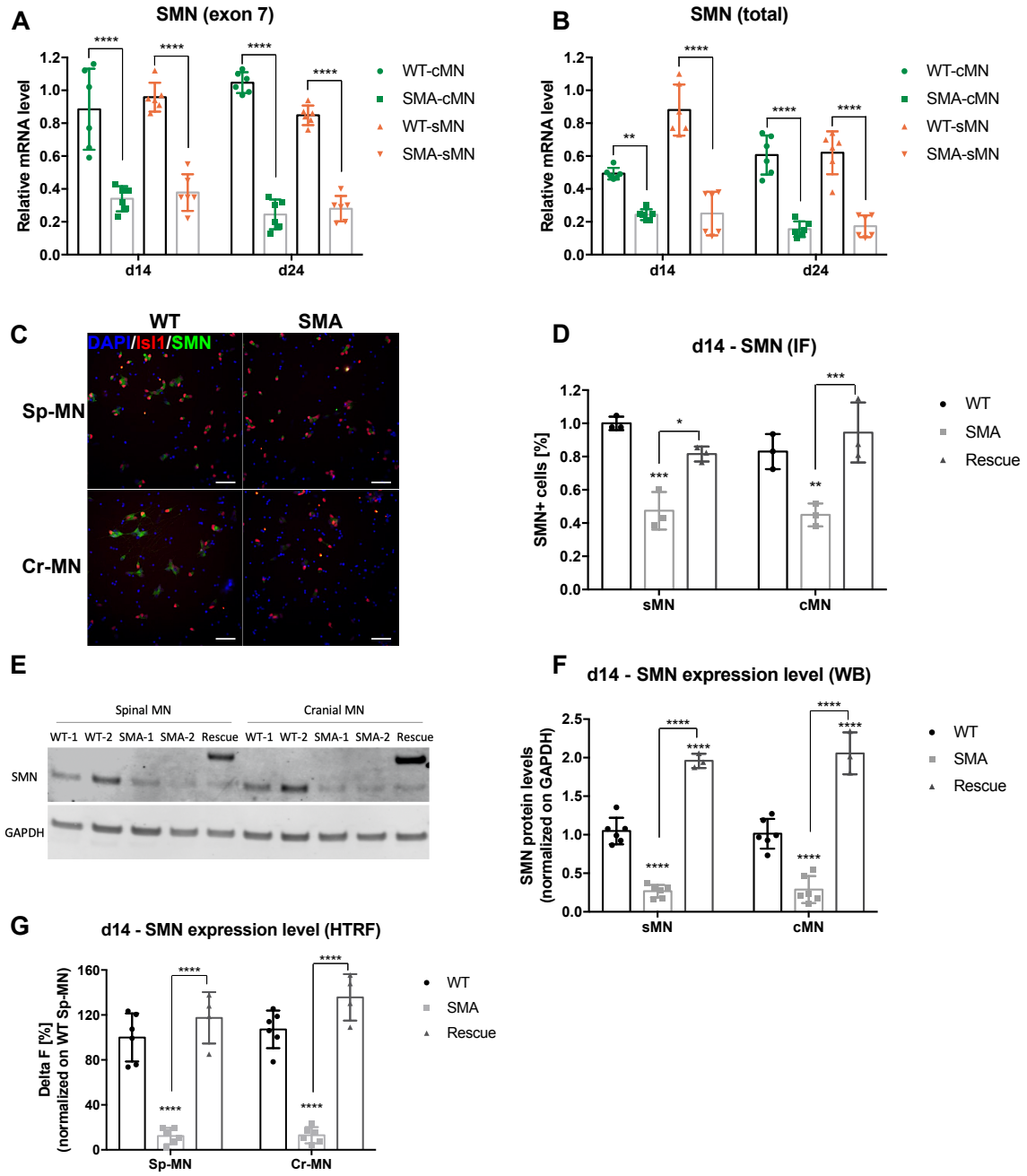
**Figure 1: Generation of the two main subtypes of MNs derived from SMA, control and rescue hiPSC.** A. Schematic representation of the differentiation protocol used to convert hiPSCs into spinal and cranial MNs. **B-D.** Representative images of immunolabeling (B) and quantification of Olig2 (red) spinal MN progenitor marker (C) and Nkx2.2 (green) cranial MN progenitor (D) marker on day 11. **E-G.** Representative images of immunolabeling (E) and quantification of cranial motor neuron markers: Isl1 (red), Phox2B (green) (F) and Phox2A (white) (G) on day 14. **H-J.** Representative images of immunolabeling (H) and quantification of spinal motor neuron markers: Isl1 (red) and Hb9 (green) (I) and neuronal marker: HuC/D (white) (J) on day 14. Scale bare: 20  $\mu$ m. Data represent the mean values  $\pm$  SD from at least 3 independent experiments perform on 3 control, 3 SMA and 1 rescue hiPSC lines. Statistics were calculated using an ordinary One-Way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test ( $p > 0.05$ , ns: not significant, \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

**Figure 2**



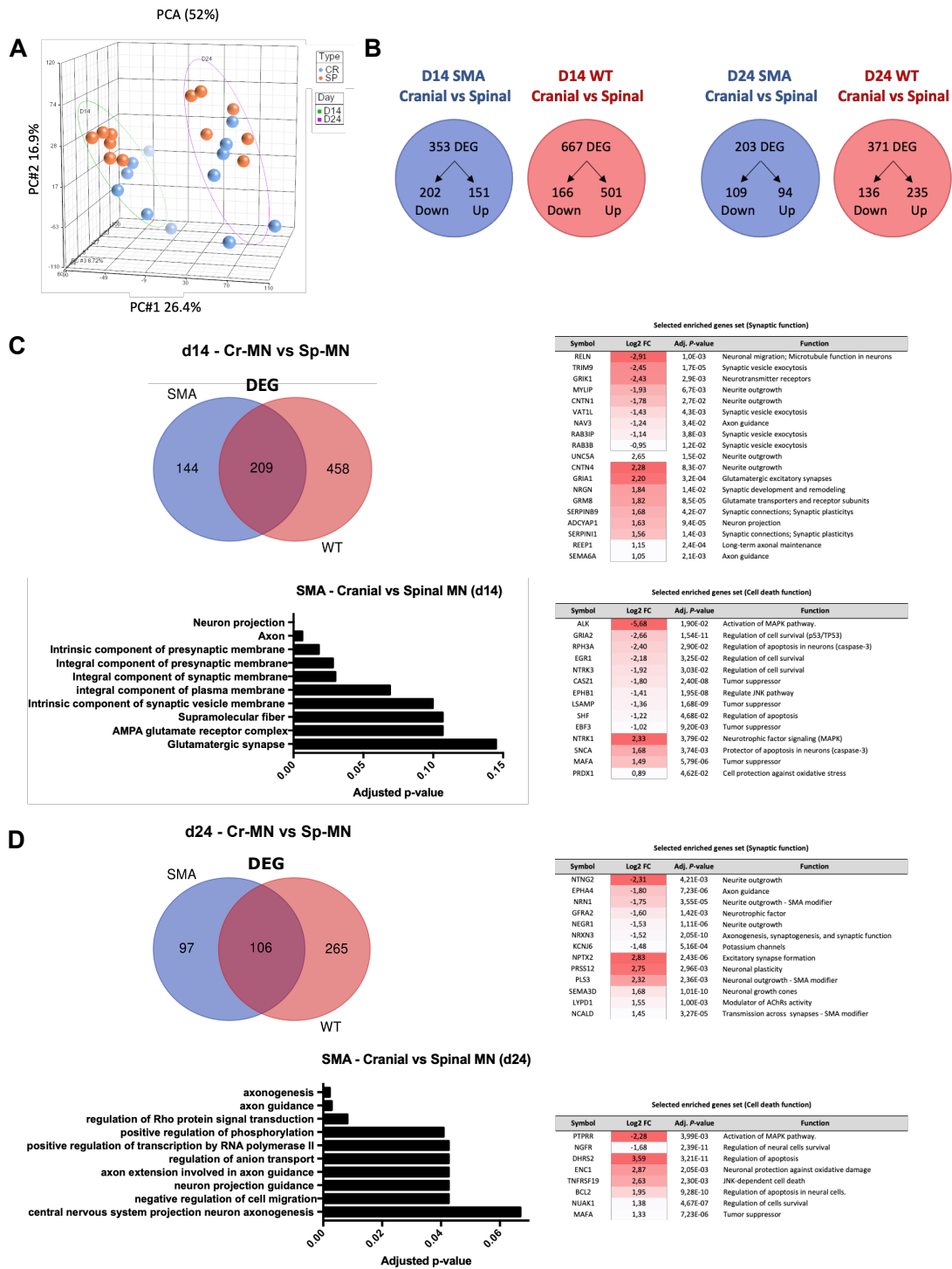
**Figure 2: Analysis of the survival of hiPSC-derived spinal MN and cranial MN from control, SMA and rescue cell lines. A-B.** Immunostaining of Isl1 (red) and Cleaved-caspase-3 (white) (A) and quantification of MNs survival using a combination of DAPI and Isl1 staining at days 18 and 24, normalized on day 14 (B). **C.** Quantification of Cleaved-caspase-3 in SMA compared to control and rescue cranial and spinal MNs at day 18 and day 24. **D,E.** Immunostaining and quantification of p-c-Jun (white) in control, SMA and rescue cranial and spinal MNs at day 18 and day 24. Scale bar: 20  $\mu$ m. Data represent the mean values  $\pm$  SD from at least 3 independent experiments perform on 3 control, 3 SMA and 1 rescue cell lines. Statistics were calculated using an ordinary One-Way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test ( $p > 0.05$ , ns: not significant,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ,  $****p < 0.001$ ).

**Figure 3**



**Figure 3: Comparison of the SMN expression level in hiPSC-derived spinal MN and cranial MN from control, SMA and rescue cell lines. A,B.** Relative expression level of SMN exon 7 (A) and total SMN (B) in control and SMA hiPSC-derived spinal MN and cranial MN after 14 and 24 days of differentiation. **C,D.** Immunostaining of Isl1 (red) and SMN (green) (C) and quantification of SMN (D) in SMA compared to control and rescue cranial and spinal MNs. **E,F.** Western blot analysis of SMN protein expression in control, SMA and rescue spinal and cranial MNs. GFAP was used as a housekeeping protein for normalization. **G.** HTRF analysis of the SMN protein level in control, SMA and rescue hiPSC-derived spinal and cranial MNs. Data represent the mean values  $\pm$  SD from 3 independent experiments in 3 control, 3 SMA and 1 rescue cell lines. Statistics were calculated using an ordinary One-Way ANOVA, Turkey's multiple comparisons test ( $p > 0.05$ , ns: not significant,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ,  $****p < 0.0001$ ).

Figure 4



Selected enriched genes set (Synaptic function)

Symbol	Log2 FC	Adj. P-value	Function
RELN	-2.91	1.0E-03	Neuronal migration; Microtubule function in neurons
TRIM9	-2.45	1.7E-05	Synaptic vesicle exocytosis
GRIK1	-2.43	2.9E-03	Neurotransmitter receptors
MYLIP	-1.93	6.7E-03	Neurite outgrowth
CNTN1	-1.78	2.7E-02	Neurite outgrowth
VAT1L	-1.43	4.3E-03	Synaptic vesicle exocytosis
NAV3	-1.24	3.4E-02	Axon guidance
RAB3P	-1.14	3.8E-03	Synaptic vesicle exocytosis
RAB39	-0.95	1.2E-02	Synaptic vesicle exocytosis
UNC5A	2.55	1.5E-02	Neurite outgrowth
CNTN4	2.28	8.3E-07	Neurite outgrowth
GRIA1	2.20	3.2E-04	Glutamatergic excitatory synapses
NRGN	1.84	1.4E-02	Synaptic development and remodeling
GRM8	1.82	8.5E-05	Glutamate transporters and receptor subunits
SERPIN9	1.68	4.2E-07	Synaptic connections; Synaptic plasticity
ADCYAP1	1.63	9.4E-05	Neuron projection
SERPIN1	1.56	1.4E-03	Synaptic connections; Synaptic plasticity
REEP1	1.15	2.4E-04	Long-term axonal maintenance
SEMAGA	1.05	2.1E-03	Axon guidance

Selected enriched genes set (Cell death function)

Symbol	Log2 FC	Adj. P-value	Function
ALX	-3.68	1.50E-02	Activation of MAPK pathway
GRIA2	-2.66	1.54E-11	Regulation of cell survival (p53/TP53)
RPH3A	-2.40	2.90E-02	Regulation of apoptosis in neurons (caspase-3)
EGR1	-2.18	3.25E-02	Regulation of cell survival
NTRK3	-1.92	3.03E-02	Regulation of cell survival
CASZ1	-1.80	2.40E-08	Tumor suppressor
EPH3L	-1.41	1.95E-08	Regulate JNK pathway
LSAMP	-1.36	1.68E-09	Tumor suppressor
SHF	-1.22	4.68E-02	Regulation of apoptosis
EBF3	-1.02	9.20E-03	Tumor suppressor
NTRK1	2.33	3.79E-02	Neurotrophic factor signaling (MAPK)
SNCA	3.58	3.74E-03	Protector of apoptosis in neurons (caspase-3)
MAFA	1.49	5.79E-06	Tumor suppressor
PRDX1	0.89	4.62E-02	Cell protection against oxidative stress

Selected enriched genes set (Synaptic function)

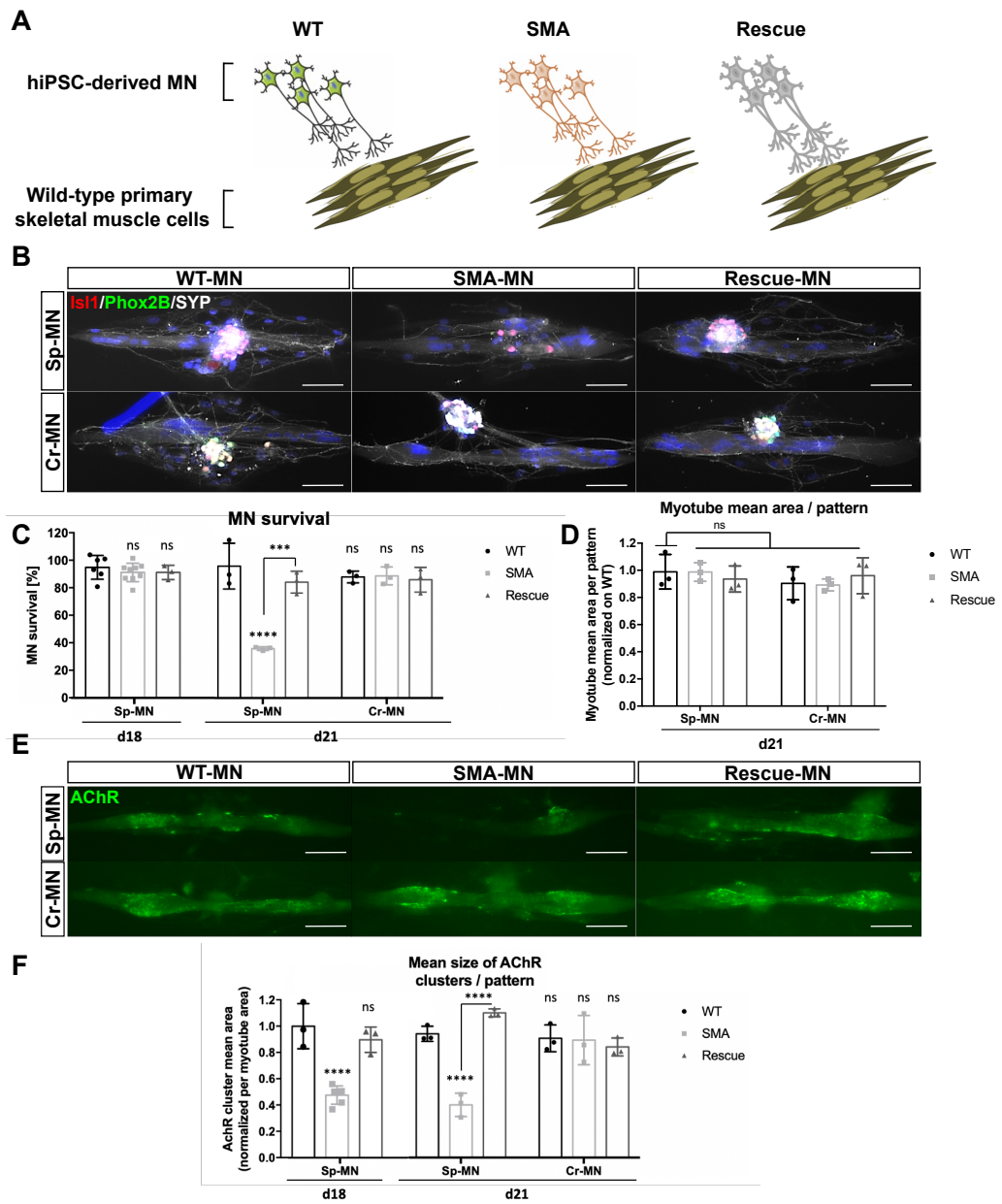
Symbol	Log2 FC	Adj. P-value	Function
NTNG2	-2.31	4.21E-03	Neurite outgrowth
EPHA4	-1.80	7.23E-06	Axon guidance
NRN1	-1.75	3.55E-05	Neurite outgrowth - SMA modifier
GFRA2	-1.60	1.42E-03	Neurotrophic factor
NEGR1	-1.53	1.11E-06	Neurite outgrowth
NRXN3	-1.52	2.05E-10	Axonogenesis, synaptogenesis, and synaptic function
KCNK5	-1.48	5.16E-04	Potassium channels
NPTX2	2.83	2.43E-06	Excitatory synapse formation
PRSS12	2.75	2.96E-03	Neuronal plasticity
PLS3	2.32	2.36E-03	Neuronal outgrowth - SMA modifier
SEMA3D	1.68	1.01E-10	Neuronal growth cones
LYPD1	1.55	1.00E-03	Modulator of AChRs activity
NCALD	1.45	3.27E-05	Transmission across synapses - SMA modifier

Selected enriched genes set (Cell death function)

Symbol	Log2 FC	Adj. P-value	Function
PTPRR	-2.28	3.99E-03	Activation of MAPK pathway
NGFR	-1.68	2.39E-11	Regulation of neural cells survival
DHRS2	3.99	3.21E-11	Regulation of apoptosis
ENCK1	2.87	2.05E-03	Neuronal protection against oxidative damage
TNFRSF19	2.63	2.30E-03	JNK-dependent cell death
BCL2	1.95	9.28E-10	Regulation of apoptosis in neural cells
NUAK1	1.38	4.67E-07	Regulation of cells survival
MAFA	1.33	7.23E-06	Tumor suppressor

**Figure 4: Transcriptional analysis of SMA or control cranial MNs versus spinal MNs by RNA-Seq analysis shows deregulation of gene sets related to synaptic function.** **A.** Principal component analysis (PCA) results. The figure displays a three-dimensional scatter plot of the first three principal components (PCs) of the data. Each point represents an RNA-Seq sample. Samples with similar gene expression profiles are clustered together. Sample groups are indicated by using different colors as indicated in the legend provided. **B.** Schematic representation of the number of DEG in SMA (blue) and WT (red) hiPSC-derived cranial and spinal MN at day 14 and day 24. **C,D.** Venn diagram representation of the number of DEG deregulated between both Control and SMA hiPSC-derived cranial and spinal MN at day 14 (C) and day 24 (D). Genes set enrichment analysis using EnrichR on the deregulated genes between SMA hiPSC-derived cranial and spinal MN at day 14 (144 genes - EnrichR analysis using GO cellular component 2021 database) (C) and day 24 (97 genes - EnrichR analysis using GO biological process 2021 database). On the right, lists of specific deregulated genes in the panel of 144 or 97 genes identified specifically in SMA hiPSC-derived cranial versus spinal MN at day 14 (C) and day 24 (D).

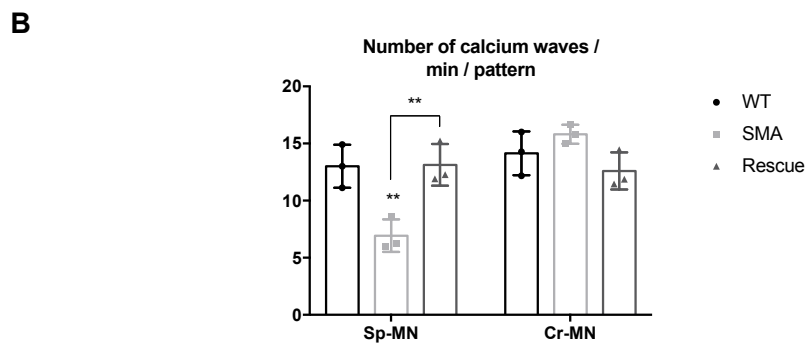
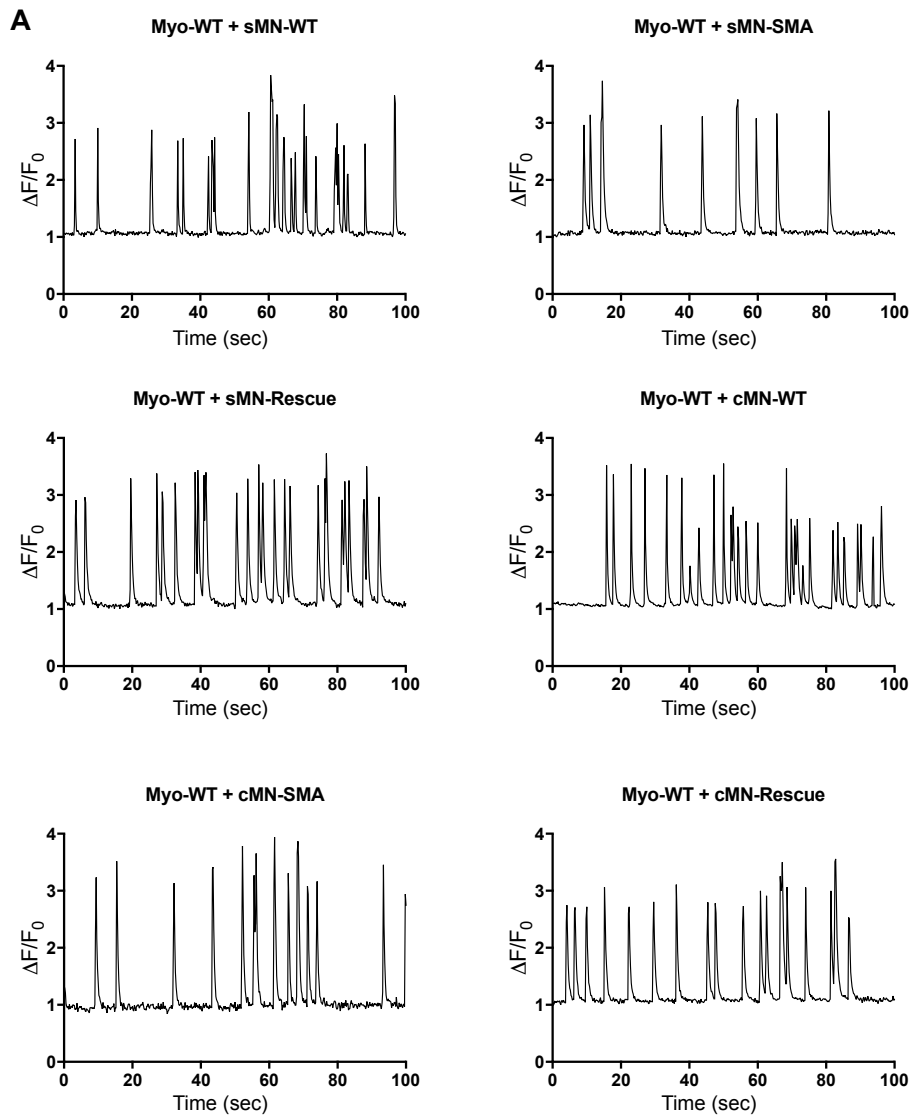
**Figure 5**





**Figure 5: Synaptic defects observed at pre- and post- levels in SMA hiPSC- derived spinal MN.** **A.** Schematic representation of hybrid co-culture systems developed in the study. **B.** Representative images of immunostaining of ISL1 (red), Phox2B (green) and synaptophysin (white) in the co-culture with spinal and cranial MN day 21 derived from the different hiPSC lines. Scale bar: 100  $\mu$ m. **C, D.** Quantification of MNs survival (C) and the mean of myotube area per pattern (D) on day 18 and day 21 of spinal and cranial MN differentiation in control, SMA and rescue conditions. **E, F.** Representative images of AChR immunolabelling (green) (E) in the co-cultures with spinal and cranial MN derived from the different hiPSC lines and the quantification of the mean size of AChR clusters per pattern (F). Scale bar: 100  $\mu$ m. Data represent the mean values  $\pm$  SD from 3 independent experiments in 2 control, 2 SMA and 1 rescue cell lines. Statistics were calculated using an ordinary One-Way ANOVA, Turkey's multiple comparisons test ( $p > 0.05$ , ns: not significant, \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

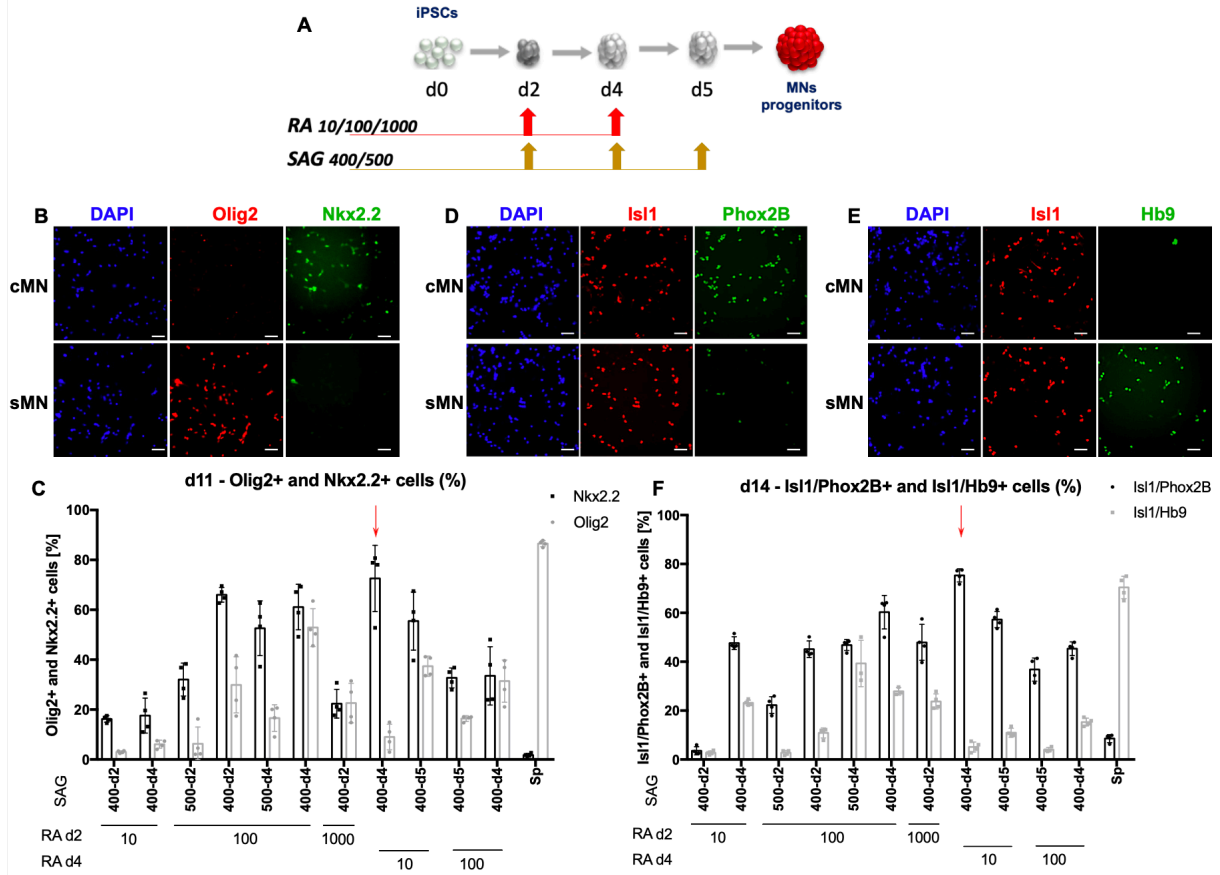
**Figure 6**



**Figure 6: Communication defect between SMA hiPSC-derived spinal MN and skeletal muscle cells.** **A.** Representative diagram of calcium waves (time = 100 sec) recorded in human primary skeletal muscle cells in different hybrid conditions (Control, SMA and Rescue spinal and cranial MN conditions).  $\Delta F/F_0$  representation after background correction. **B.** Quantification of the number of calcium waves recorded in human primary skeletal muscle cells per pattern and per min after 11 days of co-culture. Data represent the mean values  $\pm$  SD from 3 independent experiments in triplicate (at least 50 micropatterns per experiment). Statistics were calculated using an ordinary One-Way ANOVA, Turkey's multiple comparisons test ( $p > 0.05$ , ns: not significant,  $**p < 0.01$ ).

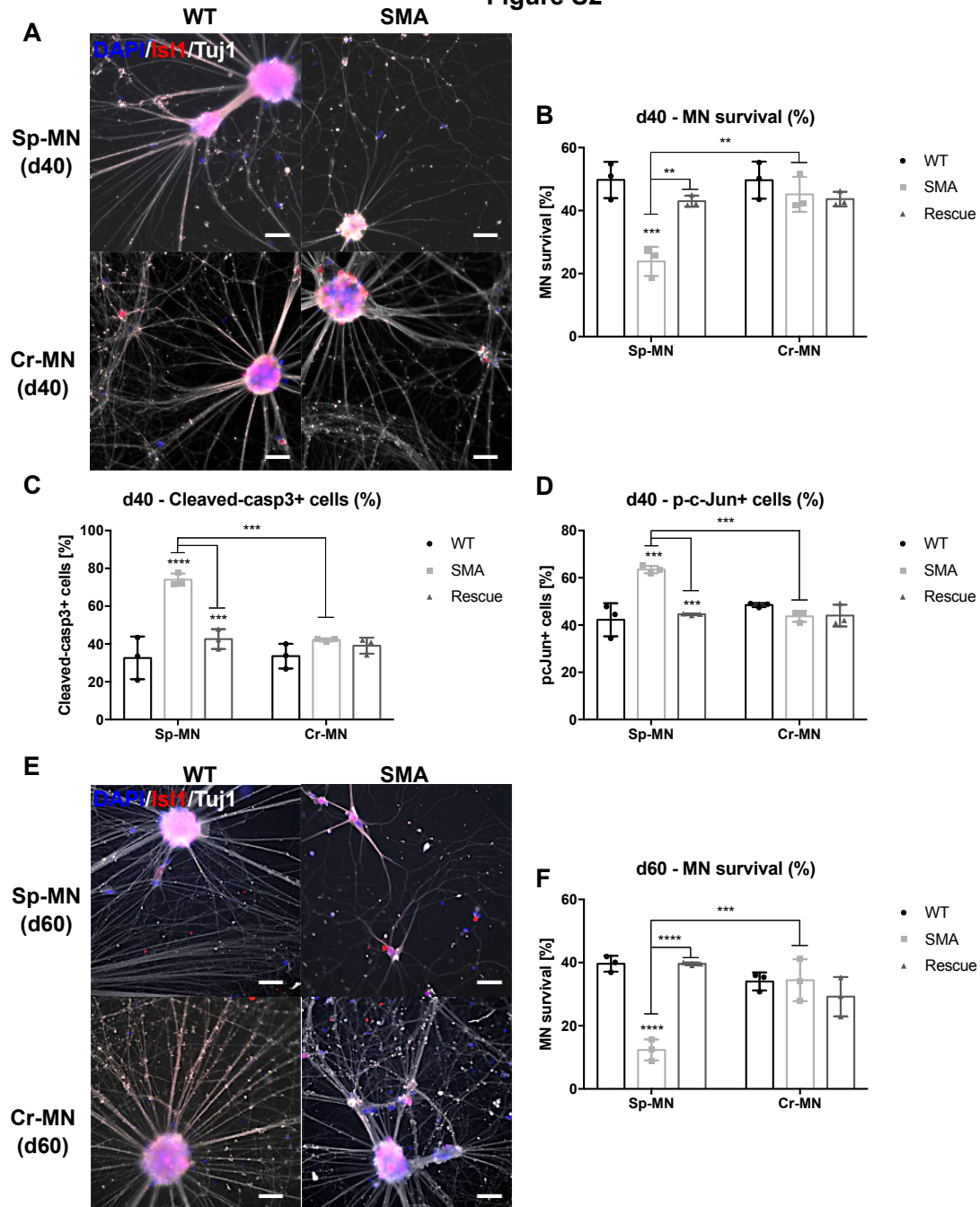
# SUPPLEMENTARY FIGURES

## Figure S1



**Figure S1: Time-dependent combinatorial action of RA and SAG to efficiently specify cranial MN.** **A.** Neuralizing embryoid bodies (SMADi) were exposed to Chir1 and various concentrations of RA, and SAG at different time points of differentiation. On day 10, cells were dissociated, replated in four 384-well plates, and further differentiated. **B,C.** Representative images of immunolabeling (B) and quantification (C) of Olig2 (red) spinal MN progenitor marker and Nkx2.2 (green) cranial MN progenitor marker on day 11. **D-F.** Representative images of immunolabeling and quantification (F) of cranial motor neuron markers (D): Isl1 (red) and Phox2B (green), and spinal motor neuron markers (E): Isl1 (red) and Hb9 (green) on day 14.

Figure S2



**Figure S2: Analysis of the survival of hiPSC-derived spinal MN and cranial MN at later time points. A-B.** Immunostaining of Isl1 (red) and Tuj1 (white) (A) and quantification (B) of MNs survival using a combination of DAPI and Isl1 staining at days 40, normalized on day 14. **C,D.** Quantification of Cleaved-caspase-3 (C) and p-c-Jun (D) in SMA compared to control and rescue cranial and spinal MNs at day 40. **E,F.** Immunostaining of Isl1 (red) and Tuj1 (white) (E) and quantification (F) of MNs survival using a combination of DAPI and Isl1 staining at days 60, normalized on day 14. Scale bar: 20  $\mu$ m. Data represent the mean values  $\pm$  SD from at least 3 independent experiments perform on 2 control, 2 SMA and 1 rescue cell lines. Statistics were calculated using an ordinary One-Way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test ( $p > 0.05$ , ns: not significant,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ,  $****p < 0.001$ ).

## SUPPLEMENTARY MATERIAL & METHOD

Antibodies	Designation	Reference	Host	Provider	Dilution	
Primary antibodies	Olig2	AB9610	Rabbit	Merck Millipore	1:500	
	Nkx2.2	74.5A5	Mouse	DSHB	1:200	
	Islet1	AF1837	Goat	R&D systems	1:500	
	Hb9	81.5C10	Mouse	DSHB	1:500	
	ChAT	AB144P	Goat	Merck Millipore	1:50	
	Tubulin $\beta$ III (Tuj1)	801201	Mouse	Biologend	1:1 000	
	Tubulin $\beta$ III (Tuj1)	PRB-435P	Rabbit	Biologend	1:1 000	
	Cleaved-caspase-3	9661S	Rabbit	Cell Signaling	1:400	
	p-c-Jun (Ser73)	3270S	Rabbit	Cell Signaling	1:800	
	Myosin Heavy Chain (MF20)	MF20	Mouse	DSHB	1:200	
	Desmin	AF3844	Goat	R&D systems	1:200	
	Acetylcholine receptor (AChR)	mAB 35	Rat	DSHB	1:350	
	SV2	SV2	Mouse	DSHB	1:50	
	Synaptophysin	PA11043	Rabbit	Thermo Fisher Scientific	1:200	
	SMN	Sc-32313	Mouse	Santa Cruz Biotechnology	1:200	
	Secondary antibodies	Donkey anti-mouse IgG(H+L) alexa fluor 568			Thermo Fisher Scientific	1:1 000
		Donkey anti-mouse IgG(H+L) alexa fluor 647			Thermo Fisher Scientific	1:1 000
Donkey anti-mouse IgG(H+L) alexa fluor 488		A21202		Thermo Fisher Scientific	1:1 000	
Donkey anti-goat IgG(H+L) alexa fluor 488				Thermo Fisher Scientific	1:1 000	
Donkey anti-goat IgG(H+L) alexa fluor 568		A11057		Thermo Fisher Scientific	1:1 000	
Donkey anti-goat IgG(H+L) alexa fluor 647				Thermo Fisher Scientific	1:1 000	
Donkey anti-rabbit IgG(H+L) alexa fluor 647				Thermo Fisher Scientific	1:1 000	
Donkey anti-rat IgG(H+L) alexa fluor 488				Thermo Fisher Scientific	1:1 000	
Hoechst (1mg/ml)				Invitrogen	1:1 000	

**Table S1: List of primary antibodies, providers, and dilutions**

Gene	Forward	Reverse
SMN (exon7)	CAAAAAGAAGGAAGGTGCTCACATT	GTGTCATTTAGTGCTGCTCTATGC
SMN (exon 2a)	TCCCGGAGCAGGAGGATT	CCACAGCTTTATCATATGCTTTTATCAG
18S	GAGGATGAGGTGGAACGTGT	TCTTCAGTCGCTCCAGGTCT
Cyclophilin A	CCCACCGTGTCTTCGACAT	CCAGTGCTCAGAGCACGAAA

**Table S2: List of primer sequences**



## REFERENCES

- Akten, B., Kye, M.J., Hao, L.T., Wertz, M.H., Singh, S., Nie, D., Huang, J., Merianda, T.T., Twiss, J.L., Beattie, C.E., Steen, J.A.J., Sahin, M., 2011. Interaction of survival of motor neuron (SMN) and HuD proteins with mRNA cpg15 rescues motor neuron axonal deficits. *PNAS* 108, 10337–10342. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104928108>
- Allodi, I., Comley, L., Nichterwitz, S., Nizzardo, M., Simone, C., Benitez, J.A., Cao, M., Corti, S., Hedlund, E., 2016. Differential neuronal vulnerability identifies IGF-2 as a protective factor in ALS. *Sci Rep* 6, 25960. <https://doi.org/10.1038/srep25960>
- Allodi, I., Nijssen, J., Benitez, J.A., Schweingruber, C., Fuchs, A., Bonvicini, G., Cao, M., Kiehn, O., Hedlund, E., 2019. Modeling Motor Neuron Resilience in ALS Using Stem Cells. *Stem Cell Reports* 12, 1329–1341. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.04.009>
- An, D., Fujiki, R., Iannitelli, D.E., Smerdon, J.W., Maity, S., Rose, M.F., Gelber, A., Wanaselja, E.K., Yagudayeva, I., Lee, J.Y., Vogel, C., Wichterle, H., Engle, E.C., Mazzoni, E.O., 2019. Stem cell-derived cranial and spinal motor neurons reveal proteostatic differences between ALS resistant and sensitive motor neurons. *eLife* 8, e44423. <https://doi.org/10.7554/eLife.44423>
- Benoit-Pilven, C., Marchet, C., Chautard, E., Lima, L., Lambert, M.-P., Sacomoto, G., Rey, A., Cologne, A., Terrone, S., Dulaurier, L., Claude, J.-B., Bourgeois, C.F., Auboeuf, D., Lacroix, V., 2018. Complementarity of assembly-first and mapping-first approaches for alternative splicing annotation and differential analysis from RNAseq data. *Sci Rep* 8, 4307. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21770-7>
- Briscoe, J., Novitch, B.G., 2008. Regulatory pathways linking progenitor patterning, cell fates and neurogenesis in the ventral neural tube. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363, 57–70. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.2012>
- Chaouch, S., Mouly, V., Goyenvalle, A., Vulin, A., Mamchaoui, K., Negroni, E., Di Santo, J., Butler-Browne, G., Torrente, Y., Garcia, L., Furling, D., 2009. Immortalized skin fibroblasts expressing conditional MyoD as a renewable and reliable source of converted human muscle cells to assess therapeutic strategies for muscular dystrophies: validation of an exon-skipping approach to restore dystrophin in Duchenne muscular dystrophy cells. *Hum Gene Ther* 20, 784–790. <https://doi.org/10.1089/hum.2008.163>
- Cifuentes-Diaz, C., Frugier, T., Tiziano, F.D., Lacène, E., Roblot, N., Joshi, V., Moreau, M.H., Melki, J., 2001. Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy. *J Cell Biol* 152, 1107–1114. <https://doi.org/10.1083/jcb.152.5.1107>
- Comley, L.H., Nijssen, J., Frost-Nylen, J., Hedlund, E., 2016. Cross-disease comparison of amyotrophic lateral sclerosis and spinal muscular atrophy reveals conservation of selective vulnerability but differential neuromuscular junction pathology: Selective Vulnerability in ALS and SMA. *J. Comp. Neurol.* 524, 1424–1442. <https://doi.org/10.1002/cne.23917>
- Edom, F., Mouly, V., Barbet, J.P., Fisman, M.Y., Butler-Browne, G.S., 1994. Clones of human satellite cells can express in vitro both fast and slow myosin heavy chains. *Dev Biol* 164, 219–229. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1193>
- Feldkötter, M., Schwarzer, V., Wirth, R., Wienker, T.F., Wirth, B., 2002. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 70, 358–368. <https://doi.org/10.1086/338627>
- Gallotta, I., Mazzarella, N., Donato, A., Esposito, A., Chaplin, J.C., Castro, S., Zampi, G., Battaglia, G.S., Hilliard, M.A., Bazzicalupo, P., Di Schiavi, E., 2016. Neuron-specific knock-down of SMN1 causes neuron degeneration and death through an apoptotic mechanism. *Hum Mol Genet* 25, 2564–2577. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw119>
- Genabai, N.K., Ahmad, S., Zhang, Z., Jiang, X., Gabaldon, C.A., Gangwani, L., 2015. Genetic inhibition of JNK3 ameliorates spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* ddv401. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv401>

- Hedlund, E., Karlsson, M., Osborn, T., Ludwig, W., Isacson, O., 2010. Global gene expression profiling of somatic motor neuron populations with different vulnerability identify molecules and pathways of degeneration and protection. *Brain* 133, 2313–2330. <https://doi.org/10.1093/brain/awq167>
- Jangi, M., Fleet, C., Cullen, P., Gupta, S.V., Mekhoubad, S., Chiao, E., Allaire, N., Bennett, C.F., Rigo, F., Krainer, A.R., Hurt, J.A., Carulli, J.P., Staropoli, J.F., 2017. SMN deficiency in severe models of spinal muscular atrophy causes widespread intron retention and DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E2347–E2356. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613181114>
- Jeziarska-Drutel, A., Attaran, S., Hopkins, B.L., Skoko, J.J., Rosenzweig, S.A., Neumann, C.A., 2019. The peroxidase PRDX1 inhibits the activated phenotype in mammary fibroblasts through regulating c-Jun N-terminal kinases. *BMC Cancer* 19, 812. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6031-4>
- Jiang, X., Kannan, A., Gangwani, L., 2019. ZPR1-Dependent Neurodegeneration Is Mediated by the JNK Signaling Pathway. *J Exp Neurosci* 13, 117906951986791. <https://doi.org/10.1177/1179069519867915>
- Kaplan, A., Spiller, K.J., Towne, C., Kanning, K.C., Choe, G.T., Geber, A., Akay, T., Aebischer, P., Henderson, C.E., 2014. Neuronal matrix metalloproteinase-9 is a determinant of selective neurodegeneration. *Neuron* 81, 333–348. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.009>
- Kariya, S., Park, G.-H., Maeno-Hikichi, Y., Leykekhman, O., Lutz, C., Arkovitz, M.S., Landmesser, L.T., Monani, U.R., 2008. Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics* 17, 2552–2569. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn156>
- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., Salzberg, S.L., 2013. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology* 14, R36. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-4-r36>
- Kong, L., Wang, X., Choe, D.W., Polley, M., Burnett, B.G., Bosch-Marcé, M., Griffin, J.W., Rich, M.M., Sumner, C.J., 2009. Impaired synaptic vesicle release and immaturity of neuromuscular junctions in spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci* 29, 842–851. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4434-08.2009>
- Lefebvre, S., Bürglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M., 1995. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80, 155–165. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90460-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90460-3)
- Lorson, C.L., Hahnen, E., Androphy, E.J., Wirth, B., 1999. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6307–6311. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6307>
- Mallinjoind, P., Villemin, J.-P., Mortada, H., Polay Espinoza, M., Desmet, F.-O., Samaan, S., Chautard, E., Tranchevent, L.-C., Auboeuf, D., 2014. Endothelial, epithelial, and fibroblast cells exhibit specific splicing programs independently of their tissue of origin. *Genome Res* 24, 511–521. <https://doi.org/10.1101/gr.162933.113>
- Maury, Y., Côme, J., Piskorowski, R.A., Salah-Mohellibi, N., Chevaleyre, V., Peschanski, M., Martinat, C., Nedelec, S., 2015. Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes. *Nat Biotechnol* 33, 89–96. <https://doi.org/10.1038/nbt.3049>
- Monani, U.R., Lorson, C.L., Parsons, D.W., Prior, T.W., Androphy, E.J., Burghes, A.H., McPherson, J.D., 1999. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet* 8, 1177–1183. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.7.1177>
- Mouilleau, V., Vaslin, C., Robert, R., Gribaudo, S., Nicolas, N., Jarrige, M., Terray, A., Lesueur, L., Mathis, M.W., Croft, G., Daynac, M., Rouiller-Fabre, V., Wichterle, H., Ribes, V., Martinat, C., Nedelec, S., 2021. Dynamic extrinsic pacing of the HOX clock in human axial progenitors controls motor neuron subtype specification. *Development* 148. <https://doi.org/10.1242/dev.194514>
- Murray, L.M., Beauvais, A., Gibeault, S., Courtney, N.L., Kothary, R., 2015. Transcriptional profiling of differentially vulnerable motor neurons at pre-symptomatic stage in the *Smn* 2b<sup>-/-</sup> mouse

- model of spinal muscular atrophy. *acta neuropathol commun* 3, 55. <https://doi.org/10.1186/s40478-015-0231-1>
- Murray, L.M., Comley, L.H., Thomson, D., Parkinson, N., Talbot, K., Gillingwater, T.H., 2008. Selective vulnerability of motor neurons and dissociation of pre- and post-synaptic pathology at the neuromuscular junction in mouse models of spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics* 17, 949–962. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm367>
- Nichterwitz, S., Nijssen, J., Storrvall, H., Schweingruber, C., Comley, L.H., Allodi, I., Lee, M. van der, Deng, Q., Sandberg, R., Hedlund, E., 2020. LCM-seq reveals unique transcriptional adaptation mechanisms of resistant neurons and identifies protective pathways in spinal muscular atrophy. *Genome Res.* 30, 1083–1096. <https://doi.org/10.1101/gr.265017.120>
- Nijssen, J., Comley, L.H., Hedlund, E., 2017. Motor neuron vulnerability and resistance in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* 133, 863–885. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1708-8>
- Nordström, U., Maier, E., Jessell, T.M., Edlund, T., 2006. An Early Role for Wnt Signaling in Specifying Neural Patterns of Cdx and Hox Gene Expression and Motor Neuron Subtype Identity. *PLOS Biology* 4, e252. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040252>
- Oprea, G.E., Kröber, S., McWhorter, M.L., Rossoll, W., Müller, S., Krawczak, M., Bassell, G.J., Beattie, C.E., Wirth, B., 2008. Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Science* 320, 524–527. <https://doi.org/10.1126/science.1155085>
- Pourtoy-Brasselet, S., Sciauvaud, A., Boza-Moran, M.-G., Cailleret, M., Jarrige, M., Polvèche, H., Polentes, J., Chevet, E., Martinat, C., Peschanski, M., Aubry, L., 2021. Human iPSC-derived neurons reveal early developmental alteration of neurite outgrowth in the late-occurring neurodegenerative Wolfram syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 108, 2171–2185. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.10.001>
- Prior, T.W., Krainer, A.R., Hua, Y., Swoboda, K.J., Snyder, P.C., Bridgeman, S.J., Burghes, A.H.M., Kissel, J.T., 2009. A positive modifier of spinal muscular atrophy in the SMN2 gene. *Am J Hum Genet* 85, 408–413. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.08.002>
- Ribes, V., Le Roux, I., Rhinn, M., Schuhbaur, B., Dollé, P., 2009. Early mouse caudal development relies on crosstalk between retinoic acid, Shh and Fgf signalling pathways. *Development* 136, 665–676. <https://doi.org/10.1242/dev.016204>
- Riessland, M., Kaczmarek, A., Schneider, S., Swoboda, K.J., Löhr, H., Bradler, C., Grysko, V., Dimitriadi, M., Hosseinibarkooie, S., Torres-Benito, L., Peters, M., Upadhyay, A., Biglari, N., Kröber, S., Hölker, I., Garbes, L., Gilissen, C., Hoischen, A., Nürnberg, G., Nürnberg, P., Walter, M., Rigo, F., Bennett, C.F., Kye, M.J., Hart, A.C., Hammerschmidt, M., Kloppenburg, P., Wirth, B., 2017. Neurocalcin Delta Suppression Protects against Spinal Muscular Atrophy in Humans and across Species by Restoring Impaired Endocytosis. *Am J Hum Genet* 100, 297–315. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.01.005>
- Rizzo, F., Nizzardo, M., Vashisht, S., Molteni, E., Melzi, V., Taiana, M., Salani, S., Santonicola, P., Di Schiavi, E., Bucchia, M., Bordoni, A., Faravelli, I., Bresolin, N., Comi, G.P., Pozzoli, U., Corti, S., 2019. Key role of SMN/SYNCRIP and RNA-Motif 7 in spinal muscular atrophy: RNA-Seq and motif analysis of human motor neurons. *Brain* 142, 276–294. <https://doi.org/10.1093/brain/awy330>
- Rodrigues, N.R., Owen, N., Talbot, K., Ignatius, J., Dubowitz, V., Davies, K.E., 1995. Deletions in the survival motor neuron gene on 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 4, 631–634. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.4.631>
- Rodriguez-Muela, N., Litterman, N.K., Norabuena, E.M., Mull, J.L., Galazo, M.J., Sun, C., Ng, S.-Y., Makhortova, N.R., White, A., Lynes, M.M., Chung, W.K., Davidow, L.S., Macklis, J.D., Rubin, L.L., 2017. Single-Cell Analysis of SMN Reveals Its Broader Role in Neuromuscular Disease. *Cell Reports* 18, 1484–1498. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.035>
- Ruggiu, M., McGovern, V.L., Lotti, F., Saieva, L., Li, D.K., Kariya, S., Monani, U.R., Burghes, A.H.M., Pellizzoni, L., 2012. A Role for SMN Exon 7 Splicing in the Selective Vulnerability of Motor Neurons in Spinal Muscular Atrophy. *Mol Cell Biol* 32, 126–138. <https://doi.org/10.1128/MCB.06077-11>
- Schellino, R., Boido, M., Borsello, T., Vercelli, A., 2018. Pharmacological c-Jun NH2-Terminal Kinase (JNK) Pathway Inhibition Reduces Severity of Spinal Muscular Atrophy Disease in Mice. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 308. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00308>

- Schellino, R., Boido, M., Vercelli, A., 2019. JNK Signaling Pathway Involvement in Spinal Cord Neuron Development and Death. *Cells* 8, 1576. <https://doi.org/10.3390/cells8121576>
- Schrank, B., Götz, R., Gunnensen, J.M., Ure, J.M., Toyka, K.V., Smith, A.G., Sendtner, M., 1997. Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9920–9925. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.18.9920>
- Vitali, T., Sossi, V., Tiziano, F., Zappata, S., Giuli, A., Paravatou-Petsotas, M., Neri, G., Brahe, C., 1999. Detection of the survival motor neuron (SMN) genes by FISH: further evidence for a role for SMN2 in the modulation of disease severity in SMA patients. *Hum Mol Genet* 8, 2525–2532. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.13.2525>
- Welby, E., Rehborg, R.J., Harmelink, M., Ebert, A.D., 2021. Assessment of CSF biomarkers and microRNA-mediated disease mechanisms in SMA. <https://doi.org/10.1101/2021.05.19.444816>
- Wirth, B., 2000. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat* 15, 228–237. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(200003\)15:3<228::AID-HUMU3>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(200003)15:3<228::AID-HUMU3>3.0.CO;2-9)
- Wirth, B., Brichta, L., Schrank, B., Lochmüller, H., Blick, S., Baasner, A., Heller, R., 2006. Mildly affected patients with spinal muscular atrophy are partially protected by an increased SMN2 copy number. *Hum Genet* 119, 422–428. <https://doi.org/10.1007/s00439-006-0156-7>
- Yener, İ.H., Topaloglu, H., Erdem-Özdamar, S., Dayangac-Erden, D., 2017. Transcript levels of plastin 3 and neuritin 1 modifier genes in spinal muscular atrophy siblings. *Pediatrics International* 59, 53–56. <https://doi.org/10.1111/ped.13052>
- Young, J., Margaron, Y., Fernandes, M., Duchemin-Pelletier, E., Michaud, J., Flaender, M., Lorintiu, O., Degot, S., Poydenot, P., 2018. MyoScreen, a High-Throughput Phenotypic Screening Platform Enabling Muscle Drug Discovery. *SLAS DISCOVERY: Advancing the Science of Drug Discovery* 23, 790–806. <https://doi.org/10.1177/2472555218761102>
- Zhang, Z., Pinto, A.M., Wan, L., Wang, W., Berg, M.G., Oliva, I., Singh, L.N., Dengler, C., Wei, Z., Dreyfuss, G., 2013. Dysregulation of synaptogenesis genes antecedes motor neuron pathology in spinal muscular atrophy. *PNAS* 110, 19348–19353. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319280110>

## Article 3

Soumis en Janvier 2022, PNAS

### **Moxifloxacin rescues SMA phenotypes in animal and patient-derived cell models**

Camille Januel<sup>1\*</sup>, Giovanna Menduti<sup>2\*</sup>, Cecile Martinat<sup>1</sup>, Vincent Mouly<sup>5</sup>, Ruben Artero<sup>3,4,&</sup>, Piotr Konieczny<sup>3,4+</sup>, Marina Boido<sup>2+</sup>

<sup>1</sup>INSERM / UEPS UMR 861, Université Paris Saclay, I-STEM, 91100 Corbeil-Essonnes, France.

<sup>2</sup>Department of Neuroscience Rita Levi Montalcini, Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi, University of Turin, Regione Gonzole 10, 10043, Orbassano (TO) Turin, Italy

<sup>3</sup>University Research Institute for Biotechnology and Biomedicine (BIOTECMED), Universidad de Valencia, Valencia, Spain. Street Dr. Moliner, 50, 46100, Burjasot, Valencia, Spain.

<sup>4</sup>Translational Genomics Group, Incliva Biomedical Research

<sup>5</sup>Center of Research in Myology, UM76, INSERM U974, CNRS UMR 7215, Batiment Babinski, GH Pitié-Salpêtrière, Paris, France

La découverte du gène *SMN1* muté, et de sa copie *SMN2* non affectée ont permis de lier le nombre de copies du gène *SMN2* à la sévérité de la maladie. Ainsi, l'amélioration spécifique de l'inclusion de l'exon 7 de *SMN2* est une approche thérapeutique prometteuse qui permet d'augmenter les niveaux de transcrits complets et, par conséquent, les niveaux de protéines SMN fonctionnelles. Chez les patients, le rapport protéine pleine longueur/protéine tronquée est d'environ 1 pour 4. Ainsi, deux approches thérapeutiques sont actuellement utilisées : l'une implique l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens (ASO) favorisant l'inclusion de l'exon 7, et l'autre est basée sur l'utilisation de petites molécules. Malgré l'existence de plusieurs thérapies aujourd'hui approuvées, le besoin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques demeure. En effet, ces thérapies commercialisées présentent certaines limites et inconvénients : voies d'administration invasives (nusinersen), efficacité dépendante de l'âge et du type de patient (plus efficace lorsque les patients sont traités à des stades précoces), effets indésirables, et coûts élevés (340 000-750 000 USD). Par conséquent, il existe toujours le besoin de développer de nouveaux traitements pour la SMA, avec un régime d'administration moins invasif, plus abordable, capable d'augmenter la quantité de protéine SMN complète et fonctionnelle et ayant la capacité de franchir la barrière hémato-encéphalique.

Sur la base de résultats prometteurs obtenus par l'équipe du Pr. Ruben Artero (Université de Valence, Espagne), après criblage de composés repositionnable pour leur capacité à induire l'expression de la protéine SMN, une collaboration s'est formée avec cette équipe et l'équipe du Dr. Marina Boido (Université de Turin, Italie) (Konieczny and Artero, 2020). L'objectif de cette collaboration était d'identifier et de valider les hits, dont la moxifloxacin, grâce à l'utilisation de différents modèles : *in vitro* humain SMA (fibroblastes, cellules musculaires, motoneurons dérivés d'hiPSC, co-culture de motoneurons et cellules musculaires), et dans un modèle *in vivo* de souris SMA.

Dans cet article, nous nous sommes concentrés sur le potentiel thérapeutique d'un antibiotique, la moxifloxacine, comme potentiellement repositionnable pour la SMA. En effet, la moxifloxacine a montré son efficacité dans nos différents modèles *in vitro* et *in vivo* SMA et entraîne une augmentation des niveaux de protéine SMN complète et fonctionnelle via l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits *SMN2*. Dans les modèles *in vitro*, nous avons démontré que la moxifloxacine permettait de restaurer la survie des motoneurons SMA ainsi que leur défaut en termes de communication avec la cible musculaire squelettique. De façon intéressante nous avons démontré que les effets bénéfiques de la moxifloxacine sur les motoneurons et leur cible musculaire s'accompagnaient d'une augmentation significative du niveau de protéine SMN dans les motoneurons SMA. Enfin, pour confirmer que l'augmentation des niveaux de protéine SMN dans les motoneurons était due à la modulation d'épissage du gène *SMN2*, nous avons mesuré par RTqPCR les niveaux des isoformes SMN-FL et SMN- $\Delta 7$ . L'augmentation dose-dépendante des niveaux de SMN après le traitement à la moxifloxacine reflète l'augmentation des niveaux d'isoforme FL avec une diminution simultanée des niveaux de SMN- $\Delta 7$ . Ainsi, ces résultats montrent que la moxifloxacine agit comme un modificateur d'épissage, favorisant l'inclusion de l'exon 7 de *SMN2* comme cela avait été précédemment montré dans les fibroblastes SMA de manière dose-dépendante (Konieczny and Artero 2020).

D'autre part, l'effet de la moxifloxacine a également été évalué sur un modèle de souris sévère SMA, la souris SMA $\Delta 7$ . Différentes analyses ont été réalisées et ont permis de démontrer que le traitement des souris SMA $\Delta 7$  à la moxifloxacine améliorait la survie et les performances motrices de ces souris. Compte tenu des améliorations motrices observées et de l'augmentation de l'expression de la protéine SMN dans les tissus SMA au niveau central et périphérique, nous avons également étudié l'effet neuroprotecteur du traitement en évaluant la survie des motoneurons. Les résultats démontrent que la densité des motoneurons est significativement plus élevée chez les souris traitées par rapport aux souris non traitées. De façon intéressante, un effet anti-inflammatoire au niveau de la moelle épinière des souris SMA $\Delta 7$  a également pu être observé. Enfin, l'administration de la moxifloxacine améliore également le phénotype de NMJ chez ces souris, en effet les NMJ des souris traitées sont plus matures et sont associées à une meilleure innervation musculaire. Ainsi, à travers cette étude nous montrons que la moxifloxacine, initialement utilisée comme antibiotique, peut être potentiellement repositionnée pour le traitement de la SMA.

# Moxifloxacin rescues SMA phenotypes in patient-derived cells and animal model

Camille Januel<sup>1\*</sup>, Giovanna Menduti<sup>2\*</sup>, Kamel Mamchaoui<sup>3</sup>, Cecile Martinat<sup>1,&</sup>, Ruben Artero<sup>4,5,&</sup>, Piotr Konieczny<sup>4,5+</sup>, Marina Boido<sup>2+</sup>

\* Contributed equally to this work and should be considered first authors

+ co-senior authors

& corresponding author

<sup>1</sup> INSERM / UEPS UMR 861, Université Paris Saclay, I-STEM, 91100 Corbeil-Essonnes, France.

<sup>2</sup> Department of Neuroscience Rita Levi Montalcini, Neuroscience Institute Cavalieri Ottolenghi, University of Turin,

<sup>3</sup> Sorbonne Université, Inserm, Institut de Myologie, Centre de Recherche en Myologie, F-75013 Paris, France

<sup>4</sup> University Research Institute for Biotechnology and Biomedicine (BIOTECMED), Universidad de Valencia, Valencia, Spain.

<sup>5</sup> Translational Genomics Group, Incliva Biomedical Research Institute, Valencia, Spain. Avenue Menéndez Pelayo 4 acc, 46010, Valencia, Spain.

## Corresponding authors

Ruben Artero, Department of Genetics/BIOTECMED, Dr. Moliner, 50. 46100 Burjasot, Valencia, Spain, +34963543028, [ruben.artero@uv.es](mailto:ruben.artero@uv.es)

Cecile Martinat, INSERM/UEVE UMR 861, I-STEM, AFM, 28, Rue Henri Desbruères, 91100 Corbeil-Essonnes – France, +330169908533, [cmartinat@istem.fr](mailto:cmartinat@istem.fr)

**Competing Interest Statement:** The authors have declared that no conflict of interest exists.

## ABSTRACT

Spinal muscular atrophy (SMA) is a genetic disease resulting in the loss of  $\alpha$ -motoneurons followed by muscle atrophy. It is caused by knock-out mutations in the *survival of motor neuron 1 (SMN1)* gene, which has an unaffected and partially functional human-specific *SMN2* copy. We previously described a *Drosophila*-based screening of FDA-approved drugs that led us to discover moxifloxacin. We showed its positive effect on the *SMN2* exon 7 splicing in SMA patient-derived skin cells and its ability to increase the SMN protein level. Here, we focus on moxifloxacin's therapeutic potential in additional SMA cellular and animal models. We demonstrate that moxifloxacin rescues the SMA-related molecular and phenotypical defects in muscle cells and motoneurons by improving the *SMN2* splicing. The consequent increase of SMN levels was higher than in case of risdiplam and exceeded the threshold necessary for a survival improvement. We also demonstrate that daily subcutaneous injections of moxifloxacin in moderate SMA murine model reduces its characteristic neuroinflammation and increases the SMN levels in various tissues, leading to improved motor skills and extended lifespan. We show that moxifloxacin, originally used as an antibiotic, can be potentially repositioned for the SMA treatment.

## INTRODUCTION

Spinal muscular atrophy (SMA) is a rare genetic neuromuscular disorder caused by the loss of alpha-motor neurons (MNs) in the spinal cord and brainstem nuclei with an incidence of 1 in 6,000 to 10,000 children. Five clinical types of SMA have been described (0, I, II, III, and IV), ranging from the complete absence of motor function and infant mortality to minor defects with no significant reduction in lifespan. SMA types originate from varying levels of the Survival Motor Neuron protein (SMN), from very low in severe cases to higher levels in the milder forms [reviewed in (1)]. The SMN protein decrease mostly affects MNs, although SMA patients also develop defects in non-CNS tissues, e.g., lungs, heart, skeletal muscles, or peripheral nervous system [reviewed in (2)]. The analysis of samples from human fetuses and data collected from animal models indicate that the muscle growth impairment occurs before the MNs degeneration (3, 4), suggesting that a systemic SMN restoration is needed for the highest therapeutic benefit.

SMA is primarily caused by loss of function mutations in the *SMN1* gene. However, due to duplication in the genome, the *SMN* locus contains two inverted copies of *SMN*, called *SMN1* (telomeric) and *SMN2* (centromeric). The difference in the coding regions of both genes is a C-to-T transition at position +6 of exon 7 (Ex7) in *SMN2* (5). This change is critical, as it results in different splicing patterns. In *SMN1*, Ex7 is included giving a full-length, functional SMN protein (FL-SMN), whereas the C-to-T transition in *SMN2* causes Ex7 exclusion in the majority of cases, giving a C-terminally truncated SMN protein ( $\Delta 7$ -SMN). A part of the *SMN2* mRNAs includes Ex7 and gives a functional FL-SMN protein (6), although insufficient to fully compensate for the *SMN1* loss. All the SMA patients carry one or more copies of the *SMN2* gene. The number of *SMN2* copies is inversely correlated with the disease severity because the amount of functional protein translated from the *SMN2* transcript partially compensates for *SMN1* deficiencies (7).

The FDA approved three SMA modifying treatments to restore the functional SMN protein in the last years. One of them is a gene therapy called onasemnogene abeparvovec (Zolgensma™), which substitutes the mutated *SMN1* with its normal version. Also, two drugs aim to increase the functional SMN protein by boosting the inclusion of *SMN2* Ex7: an antisense oligonucleotide named nusinersen (Spinraza™) and the small molecule drug risdiplam (Evrysdi™) (8). Despite the remarkable efficiency of these treatments, they also present disadvantages in administration method, patient exclusion criteria, or access due to the therapy's high cost (9–11). Moreover, the limited data on the long-term efficacy and safety of these innovative therapies makes it crucial to continue to search for alternative, backup treatments for SMA. The repositioning approach drastically shortens the time needed for a drug to become a new therapy for patients (12, 13). Our previous research combined this strategy with a novel *Drosophila*-based screening method and reported moxifloxacin, a fluoroquinolone antibiotic, to be an effective *SMN2* Ex7 splicing booster in SMA patient fibroblasts (14). This paper investigates moxifloxacin's effect on the SMA molecular and phenotypical hallmarks in MNs generated from patient-derived induced pluripotent stem cells and a human in vitro model of NMJs, and in a moderate SMA murine model, further reinforcing its therapeutic potential. The well-known profile of this drug makes it an exciting candidate for a clinical trial.



## RESULTS

### SMA type I motor neurons

We first sought to evaluate the potential effect of moxifloxacin on motoneurons, the primary cell type affected in SMA. The effect of moxifloxacin was evaluated on the survival of MNs derived from induced pluripotent stem cells (iPSCs) from two different SMA type I patients. The conversion of the human iPSCs into spinal MN was performed as previously described (15). Briefly, the protocol used is a four-stage process that involves neural induction, generation of motoneuron progenitors, their conversion into motoneurons (Day 14), and their final maturation (Day 24) (Figure 1A). The percentage of Isl-1 positive cells was measured at day 14 and compared to the control wild-type MNs (Supplementary Figure 1). We started the treatment with moxifloxacin at this early stage and continued for the next 10 days until day 24, when a significant decline of the cells' survival is already observed in the SMA condition (Figure 1B).

Early-born MNs were treated with moxifloxacin at 10 concentrations ranging from 100  $\mu\text{M}$  to 0.8  $\mu\text{M}$  with the solvent (DMSO) at 0.1%. The FDA-approved molecule Risdiplam at 0.5  $\mu\text{M}$ , as well as a neuroprotective JNK inhibitor, Kenpaullone (Januel C. *et al.*, submitted), were used as a positive control in this assay and healthy wild-type MNs cultures. The motor neurons survival rate was measured by counting ISL1 positive cells from day 14 to day 24. We observed that moxifloxacin significantly decreased the death rate of the SMA MNs, at levels similar to the healthy cells (Figure 1B-C). The most effective concentration was 3.2  $\mu\text{M}$ , which is over 150x lower than the one used previously in SMA fibroblasts (14), showing the high efficiency of the drug in MNs. As previously described, we observed a reduction in the number of motor neurons as detected by quantifying the number of ISL1 positive cells in SMA compared to wild-type conditions, a phenotype that can be normalized after moxifloxacin treatment. Similar to the survival experiment, moxifloxacin at 3.2  $\mu\text{M}$  proved to be the most efficient in increasing the SMN protein levels (Figure 1D). The SMN levels after moxifloxacin treatment are lower than the SMN wild-type levels; nevertheless, the survival rates of wild-type and treated cells are very similar. Finally, to confirm that the increase of the SMN protein in MNs is due to the *SMN2* splicing modulation, we measured the FL and  $\Delta 7$  isoforms by RT-qPCR. The dose-dependent increase in SMN levels after moxifloxacin treatment reflects the increase of FL isoform levels with simultaneous decrease of  $\Delta 7$  transcripts (Figure 1E). Taken together, these results show that moxifloxacin acts as a splicing modifier, promoting the inclusion of *SMN2* Ex7 as it was previously showed in SMA fibroblasts in a dose-dependent manner (14).

### SMA type I myoblasts and motor neurons co-culture

As dramatic alterations at the neuromuscular junctions have been described prior to symptom onset (16), we next sought to evaluate the therapeutic potential of moxifloxacin in a human in vitro model of NMJ. For this purpose, we used co-cultures between SMA hiPSC-derived MNs (and WT MNs as control) and human primary skeletal muscle cells isolated from an SMA type 1 patient as previously described. To improve myogenic maturation, skeletal muscle cells were grown on micropatterned 384 well plates in which each well contains around

50 micropatterns (17) (Tahraoui-Bories *et al.*, Januel C *et al.*, submitted) (Figure 2A). Co-cultures were treated every 3 days for one week, and then different parameters were evaluated such as the survival of MNs, the myogenic differentiation into myotubes and their ability to connect each other (Figure 2B).

We observed that in the co-culture conditions, treatment with moxifloxacin led to the normalization of MNs survival as observed in cultures of MNs alone (Figure 2C), which was also clearly capable of increasing the myotube area (Figure 2D) and restoring the AChR clustering area (Figure 2E) of SMA myotubes. When compared to the vehicle-treated cells, the increase was over 20% of the myotube area per pattern and AChR area per pattern normalized to SMA myotube in co-culture with healthy MNs. Thus, moxifloxacin not only enhanced SMA MN survival but improved their ability to establish functional NMJ with SMA myotubes and promoted their growth to approximately 70% of the ability that normal MNs have to rescue SMA myotube growth *in vitro*.

### **Effects of moxifloxacin treatment on survival and motor performances of delta 7 SMA mice**

To investigate the efficacy of moxifloxacin administration in the delta 7 SMA murine model (18), we first assessed whether the treatment could extend the lifespan of the treated mice by daily injecting the pups from P2 until death. Indeed, we observed that the administration of moxifloxacin significantly increased the lifespan of treated mice, whose median survival was 45% higher compared to vehicle-treated (VHL) group (Figure 3A). Then, we decided to characterize better the moxifloxacin effects on SMA-related phenotypic signs and motor performances. For these analyses, treated and untreated pups underwent behavioural tests starting from P2 and were sacrificed at P12.

The weight assessment (Figure 3B-C) showed an overall constant increase in the mean body weight in moxifloxacin-treated mice compared to VHL, becoming significant from P8 onwards (P8: + 34%; P9: + 37%; P10: + 39%; P12 + 34%). Furthermore, despite the slight weight loss occurring in the last phase of the disease, the moxifloxacin mice always exhibited greater motor strength and activity than VHL (Supplementary Video 1).

Starting from P2/P4, the motor skills of treated mice were evaluated with a battery of behavioural motor tests specifically designed for delta 7 mice pups (19). The results highlighted a general improvement in hindlimb posture and muscle strength in moxifloxacin-treated mice compared to controls. Indeed, compared to VHL (showing hindlimbs often close together), the treated mice showed higher scores both in the tail suspension test (Figure 3D) from P5 to P11 and in the hindlimb suspension test (Figure 3E) with a 1-fold increase at P10-P11 (P10: +104.3 %; P11: +154%), showing almost completely spread hindlimbs.

The results of the righting reflex test (Figure 3F) showed a positive tendency of moxifloxacin mice in righting themselves when placed on their backs in less time than in control mice, suggesting enhanced muscle strength. Considering the percentage of mice that successfully completed the test, we observed that 44.44%, 77.80% and 44.44% of treated mice righted themselves respectively at P4, P8 and P10, compared with 9.52%, 23.53% and 6.67% of controls. In addition, the latency to complete the test is shown in Supplementary Figure 2A, revealing a statistically significant difference between the groups at P8 (moxifloxacin:  $13.23 \pm 3.36$  s; VHL:  $27.84 \pm 1.13$  s).

Finally, as assessed by the negative geotaxis test (Figure 3G), vestibular and motor coordination improved significantly in moxifloxacin-treated mice compared to the VHL group, starting from P7 to P12. Interestingly, at P12 the percentage of treated delta 7 mice able to complete the test (in 60 s) was 89% compared to 25% in the control group. The latency to complete the test is shown in Supplementary Figure 2B and confirms statistically significant differences from P8 to P12 between the two groups.

Overall, these results suggest a general improvement in the health (lifespan and weight gain), and strength and motor coordination (behavioural tests) of the skeletal muscles of SMA mice upon moxifloxacin administration compared to control animals.

### **Moxifloxacin treatment exerts a neuroprotective and anti-inflammatory effect at the level of the murine spinal cord**

Previous results reported that moxifloxacin, acting as an *SMN2* modifier, can increase SMN protein levels in patients' fibroblasts (14) and motoneurons. To confirm such findings *in vivo*, first we performed an immunoblotting analysis on the spinal cord of VHL and drug-treated delta 7 SMA mice. The SMN protein levels were significantly increased in the moxifloxacin group, by approximately 34% compared with controls (Figure 4A). This observation was confirmed using a fully automated Simple Western™ platform, which allowed a precise measurement of the SMN protein and normalization to the total protein instead of an endogenous control like vinculin. With this alternative method, we observed a 57% increase of SMN after the treatment with moxifloxacin (Supplementary figure 3A).

Given the observed motor improvements in delta 7 mice and the SMN expression increase in the spinal cord, we then investigated the neuroprotective effects of the drug treatment by evaluating the lower MN survival in the disease model. With this aim, stereological MN counts and quantification of apoptotic profiles in the moxifloxacin and VHL treated mice were performed, analysing the lumbar (L3-L5) spinal cord tract. Our results showed a significantly higher MN density in moxifloxacin-treated mice ( $2,454 \pm 261.8$  MNs/mm<sup>3</sup>) compared to VHL ( $1,421 \pm 233.7$  MNs/mm<sup>3</sup>) (Figure 4B), suggesting that the treatment was effective in delaying the SMA-associated cell death of MNs.

Concerning apoptosis marker quantification (Figure 4C), by confocal immunofluorescence analysis, we evaluated in experimental and control groups the Cleaved Caspase 3 positive cell percentage in the spinal cord ventral horns (lumbar track) of delta 7 mice, where the SMI32-positive MNs are located (20). Results show a significant general reduction of Cleaved Caspase 3 positive cells in moxifloxacin mice ( $1.39 \pm 0.18\%$ ) compared to controls ( $3.00 \pm 0.36\%$ ), confirming the efficacy of the treatment in delaying cell death mechanisms in delta 7 mice.

Together with MN degeneration, SMA is characterized by increased neuroinflammation in the spinal cord, as it commonly occurs in many neurodegenerative diseases. In particular, astrocytes' active role and contribution in influencing the severity of SMA pathology has been suggested, and astrogliosis has been found prominently in end-stage delta 7 mice (21). To investigate whether moxifloxacin neuroprotective effects could be extended to reducing neuroinflammation, we assessed the levels of astrogliosis (GFAP-positive signal) in the spinal cord ventral horns by confocal immunofluorescence (Figure 4D). Results showed that the treatment significantly reduced the percentage of GFAP-immunopositive profile density by

approximately 48% in delta 7 mice with respect to the control group. The modulation of the astrocyte activation could contribute (or be consequent) to moxifloxacin-dependent MN preservation.

### **Moxifloxacin increases the SMN expression in the skeletal muscles and counteracts the muscular atrophy in delta 7 SMA mice**

We then verified the therapeutic effect of moxifloxacin at the muscular level by analysing two hindlimb skeletal muscles (quadriceps and gastrocnemius). To evaluate the SMN expression, we performed an immunoblotting analysis on quadriceps and gastrocnemius muscles of VHL and drug-treated delta 7 SMA mice. Significant differences were observed in the quadriceps muscle samples of moxifloxacin mice, which showed an increase in SMN protein of approximately 91% compared to controls (Figure 5A). While reporting a positive trend of increasing SMN protein levels in moxifloxacin mice (by 28%), the results with the gastrocnemius muscle were not significantly different between treated and untreated mice (Figure 5B). The samples from both muscles were also analysed using the Simple Western™ and in the case of the quadriceps we observed a 78% increase in SMN levels normalized to total protein (Supplementary Figure 3B). The very low basal SMN levels detected by Simple Western™ in gastrocnemius did not provide sufficient signal to perform a reliable analysis.

Overall, SMN immunodetection results in muscles confirmed the previous findings in the spinal cord, indicating that moxifloxacin treatment can increase SMN protein levels in SMA tissues in the central nervous system and peripheral levels.

Prompted by these positive results, we then verified the efficacy of moxifloxacin on muscle trophism. To this aim, we first performed morphological analyses of the H/E stained quadriceps and gastrocnemius muscles at P12 (Figure 5C). We evaluated the mean fiber area, perimeter, and the Feret's diameters of 100 muscle fibers per animal (Tables 1-2; Figure 5D). Concerning the quadriceps, the results displayed that the moxifloxacin-treated mice showed a significant increase in fiber area (+100%), fiber perimeter (+ 43%), and Feret's diameters (min Feret: + 49%, Max Feret: + 40%). Regarding the analysis of gastrocnemius morphology, only a slight tendency to higher fiber parameters was evident in delta 7 mice treated with moxifloxacin compared to untreated ones, without reaching a statistically significant difference. These results suggest that moxifloxacin treatment can effectively delay skeletal muscle fiber atrophy and are consistent with the unchanged levels of SMN in gastrocnemius.

### **Moxifloxacin administration also improves NMJ phenotype in delta 7 SMA mice**

Given the positive effects of moxifloxacin on skeletal muscle trophism, NMJ innervation and morphology were also assessed by analysing treated and untreated quadriceps and gastrocnemius muscle samples from delta 7 mice at P12.

During development, myofibers undergo a multiple to single innervation process: therefore, the presence of mono-innervated NMJs, together with a high number of endplate perforations, indicates a more mature stage (16). NMJ innervation was analysed for the number of neurofilament (NF) contacting the endplate (Figure 6A-B); results showed a significant decrease in multi-innervated NMJs ( $18.10 \pm 2.70\%$ ) and an increase in the percentage of mono-innervated junctions in moxifloxacin treated quadriceps ( $58.31 \pm 1.06\%$ ), compared to controls (VHL multi-innervated NMJs  $30.32 \pm 2.07\%$ ; VHL mono-innervated NMJs  $27.62 \pm 0.57\%$ ).

We also observed a significant reduction in denervated endplates in moxifloxacin mice compared to controls (moxifloxacin:  $23.58 \pm 3.73\%$ ; VHL:  $41.87 \pm 2.49\%$ ). Similarly, NMJ innervation analysis in gastrocnemius showed in moxifloxacin treated mice a significant reduction in multi-innervated NMJ percentage (moxifloxacin:  $29.77 \pm 2.98\%$ ; VHL:  $44.77 \pm 1.69\%$ ) and an increase in mono-innervated NMJ percentage in comparison with the VHL group (moxifloxacin:  $54.00 \pm 0.57\%$ ; VHL:  $34.20 \pm 1.17\%$ ). No significant difference between the two groups was observed in the percentage of denervated NMJs.

The presence of perforations in the NMJs was also assessed (Figure 6C-D), and we classified the endplates as mature (i.e., showing perforations) and immature (no perforations) (22, 23). The results showed that moxifloxacin treatment significantly increased the percentage of mature NMJs in delta 7 mice compared to the VHL group (moxifloxacin:  $58.22 \pm 2.26\%$ ; VHL:  $26.05 \pm 1.42\%$ ) in the quadriceps. A slight increase in the percentage of mature NMJs following treatment was also observed in the gastrocnemius (moxifloxacin:  $58.86 \pm 6.54\%$ ; VHL:  $43.16 \pm 6.09\%$ ), although without reaching a statistically significant difference.

Therefore, the administration of moxifloxacin to delta 7 mice supports the skeletal muscle trophism and leads to acquiring a more mature phenotype of NMJs and a better muscular innervation.

## DISCUSSION

We have previously shown that moxifloxacin increases the SMN protein levels in SMA fibroblasts by boosting *SMN2* exon 7 inclusion. We also observed an increase of SRSF1 expression, the main exon 7 splicing enhancer, and related that to the moxifloxacin-triggered inhibition of topoisomerase II (TOP2)(14). There is a precedence for fluoroquinolones influencing splicing by such mechanism of action, like in the case of caspase 2 splicing, where the increased exon 9 inclusion is most likely caused by increased expression of regulatory splicing factors as a consequence of TOP2 inhibition (24, 25). It is possible that the moxifloxacin triggered inhibition of the TOP2A results in a quick and global release of polymerase II from promoter-proximal pausing, which results in the upregulation of interdependent transcription and splicing factors (24, 25).

As a continuation of our previous work in fibroblasts, we show that moxifloxacin also increased the *SMN2* exon 7 inclusion in SMA type I MNs. That was consequent with increased SMN levels and almost complete rescue of the SMA MNs degeneration. Interestingly, the treatment restored only around 30% of SMN normal levels in a healthy control cell line, but the rescue of MN degeneration was around 90% at some concentrations. This indicated that even a relatively discreet increase in SMN protein can significantly impact the phenotypes of the cell model, and moxifloxacin treatment did overcome such threshold. Notably, the survival rate and the SMN protein levels after moxifloxacin treatment are above the results obtained with the current first-line drug risdiplam.

These promising *in vitro* results were further investigated *in vivo*. To this aim, we evaluated the effects of the chronic administration of moxifloxacin in the most used and characterized type II SMA model, the delta 7 mice that reproduces the main disease hallmarks at both behavioural and cellular levels (18).

We confirmed that moxifloxacin was able to significantly increase SMN protein levels (both in the spinal cord and skeletal muscles), and consequently delay neurodegeneration, and improve muscle trophism and NMJ phenotypes in the SMA mice. Indeed, the SMN-dependent mechanism of action of moxifloxacin has been demonstrated by molecular and stereological analysis in the spinal cord of treated mice, where an increase in FL-SMN protein levels and the density of lower MNs in the lumbar spinal tract were observed, in comparison with controls. Moreover, according to previous evidence highlighting that the SMA pathophysiology is correlated with altered levels of apoptosis-related proteins (e.g., Bax, Bcl-xL, Bcl2) (12, 20, 26–29), we observed a significant reduction of cells positive to Cleaved Caspase 3 (a pro-apoptotic marker) in moxifloxacin-treated mice compared to untreated pups, confirming the efficacy of the drug in modulating cell death mechanisms.

We also observed a significant decrease in the astrocyte activation at the spinal cord level. On one side, this could depend on the reduced neurodegeneration observed since these two processes, cell death and neuroinflammation, are strongly intertwined (30–32). On the other side, interestingly, it has been reported that the restoration of SMN in MNs can only determine slightly enhanced recovery and survival of SMA mice, while a winning strategy could be increasing SMN protein levels also in other cellular populations such as astrocytes, which dysfunction is known to exacerbate SMA condition (21, 33, 34). Moreover, in addition to the splicing modifier role of moxifloxacin, the fluoroquinolone family can exert immunomodulatory and anti-inflammatory activities *per se*, by inhibiting the production of a number of pro-inflammatory cytokines (as IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-8) (35–39) and reducing neuroinflammation at the CNS level (40).

Concerning the skeletal muscles, we first analysed the SMN expression, whose presence is pivotal for their correct functioning. Indeed, in 2020, Kim and coll. demonstrated that the selective SMN deprivation in these tissues can determine muscle fiber defects, NMJ abnormalities, and compromised motor performance (3). We observed that moxifloxacin treatment significantly increased SMN protein levels in the quadriceps, while only a positive trend was visible in the gastrocnemius compared to controls. Accordingly, the analysed morphological parameters (i.e., fiber size, perimeter and Feret's diameters (23) indicated a significantly enhanced trophism only for the quadriceps slices. These differences could depend on the type of muscle. Indeed, in the case of SMA, proximal muscles (as quadriceps) are earlier affected and to a greater extent than the distal ones (as gastrocnemius) due to the selective vulnerability of MNs innervating proximal muscles (41). This could suggest that moxifloxacin effects on trophism are more evident in the most affected muscles, while in the others (“more resistant”), it is possible to see only a positive trend. These observations were also partially confirmed by the NMJ analyses performed, which again highlighted the most remarkable improvements in the quadriceps compared to the gastrocnemius. Indeed, in the latter one, the percentage of denervated NMJs was unchanged compared to the VHL group, whereas significantly reduced in the quadriceps. The dissimilarity between the two muscles could also stem from different expression levels of moxifloxacin's primary target, i.e., TOP2A. The RNA-seq data available (<http://muscledb.org/>) shows that the TOP2A expression in gastrocnemius is twice that in quadriceps. This means that higher moxifloxacin concentration is expected to be needed in gastrocnemius to effectively repress TOP2. We also analyzed the diaphragm of the moxifloxacin-treated mice, and we have not detected any change in the SMN levels

(Supplementary Figure 4). This is consistent with our hypothesis since the TOP2A levels in the diaphragm are triple compared to the quadriceps. Initially, the levels of main SMN2 splicing factors in gastrocnemius and quadriceps are similar, according to the database.

In contrast, by analysing the innervation/maturation of endplates, we noticed that both muscles showed an improvement, characterized by a significantly higher percentage of mono-innervated NMJs. As known, in SMA mouse models, the formation of the NMJs proceeds normally, but their maturation stalls (42), and the lack of SMN seems to have a central role in both processes [reviewed in(16)]. Therefore, we can speculate that by enhancing the SMN production and improving the reciprocal signalling between MNs and muscles [in turn important for the formation and maintenance of NMJs (43)], moxifloxacin successfully contributed to sustaining the endplate maturation progress.

Overall, such muscle and NMJ phenotype ameliorations justify the positive results obtained in the body weight assessment and the behavioural tests, highlighting the reduced muscle atrophy and the improved motor performances (in terms of posture, strength, and coordination), compared to the control group. We also performed a survival study, and although a certain variability in the disease progression has been reported for this mouse model (44), we observed a significant lifespan extension in treated mice compared to controls (+ 45%). Indeed, moxifloxacin-treated mice achieved a median lifespan of 14.5 days: this increase can be considered remarkable related to the extremely short lifespan of delta 7 mice (on average 10 days for the VHL-treated group, in this work).

To our knowledge, compared to previously repositioned drugs with SMN-dependent effect (especially those influencing the alternative splicing of SMN2 pre-mRNA) (12, 45), the antibiotic moxifloxacin for the treatment of delta 7 mice resulted in higher-reaching improvements in SMA condition rescuing, ranging from positive outcomes concerning survival and motor behaviour, SMN protein level increase in different tissues, to delayed neurodegeneration, modulated neuroinflammation and improved NMJ maturation/innervation. Preclinical data from patient-derived MNs and a severe SMA mouse model encourage the clinical repurposing of the molecule. Specifically, the degree of the rescue of MN survival is higher than risdiplam at the highest non-toxic concentration. However, we could not compare side by side risdiplam and moxifloxacin in similar experiments *in vivo*.

By validating moxifloxacin as a candidate drug for SMA, we prove that drug repositioning is a valuable strategy for discovering new therapies for rare diseases. In particular, repurposed drugs can reach patients faster than new molecules (12), and may target disease pathways from different perspectives, thus enriching therapeutic options either as stand-alone drugs or to complement therapies that have already reached human use authorization.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Human induced pluripotent stem cells**

Human induced pluripotent stem cell lines (hiPSC) were generated by reprogramming Coriell Biorepository fibroblasts derived from non-affected and SMA affected patients as previously described (15). Three independent hiPSC clones were generated from each line of

healthy fibroblasts GM03814 and C03. Similarly, 3 independent clones of hiPSC were generated from each fibroblast lines issues from two type SMA type 1 patients (GM03813 or GM00232). Informed consents were obtained from all the patients included in this study, complying with the ethical guidelines of the institutions and with the legislation requirements. Experimental protocols were approved by the French minister of health (2019-A02599-48). In addition to these hiPSC lines, an isogenic control line was generated from one SMA hiPSC line (GM03813) in which a plasmid containing SMN (pEF1aFlagbiotagSMN-PGKpuro, kindly gift of H. Wichterle and S. Nedelec) was stably transfected. Briefly, cells were nucleofected with 5 µg of linearized plasmid (*Cla*I enzyme) (AMAXA Program 23). Cells were selected for 8 days with puromycin (1 µg/ml). The integration of the transgene was validated by immunostaining for the Tag and by western blot for SMN.

All the different hiPSC lines were grown on culture dishes coated with vitronectine (Gibco) and maintained in iPS-Brew XF medium (Miltenyi Biotec) as previously described (46). Cell passaging was performed manually every 5 days and culture medium was changed every two days.

### **Generation of spinal motor neurons from hiPSCs**

The conversion of hiPSC into spinal motoneurons was performed as previously described (47). Briefly, hiPSC were dissociated enzymatically using Stem Pro Accutase (ThermoFisher®) during 5min at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> and plated in 25cm<sup>2</sup> flasks (Dutscher®) at 2 million per flask in an induced-motoneuronal medium supplemented with cytokines every two days. After 10 days of differentiation, embryoid bodies were dissociated. Between days 10 and 14, MN progenitors are converted into MNs, and motoneuron phenotype was assessed by immunolabeling for Islet1.

### **Co-culture of human iPSC-derived spinal MN and human skeletal muscle cells**

Human primary and immortalized non-affected and SMA myoblasts were obtained from the MyoLine platform from the Institute of Myology and provided by Vincent Mouly (48). They were derived from patients and control biopsies provided by MyoBank, affiliated to EuroBioBank with the French ministry agreement ref AC-2019-3502. Skeletal muscle cells were obtained from a quadriceps muscle biopsy of a 5 day-old unaffected infant (CHQ or Ctl) (49), a paravertebral muscle biopsy of an 11-year-old infant patient suffering from SMA (KM432-7PV or SMA type I) and a paravertebral muscle biopsy of a 7-year-old infant patient suffering from SMA (KM1150-11PV or SMA type II). Primary cells were isolated from skeletal muscle, expanded and differentiated as described previously (48). Briefly, primary and immortalized myoblasts were cultured in a growth medium and cryopreserved. The percentage of myoblast cells was estimated by immunolabelling for Desmin. For co-culture, spinal MNs must be differentiated from hiPSC as described previously, but the embryoid bodies are dissociated at day 14 of differentiation and frozen. 384 micropatterned-well plates were designed and provided by CYTOO SA (17). The co-cultures were performed as previously described (Tahraoui *et al.*, submitted). Briefly, myoblasts were plated at a density of 5.500 cells per well in myoblast growth medium (DMEM/F12-glutamax supplemented with 20% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich) and 0.1% penicillin-streptomycin (ThermoFisher) with Y-27632 (10 µM, Stemcell). After 2 days, the growth medium was replaced by the differentiation



medium (DMEM/F12-glutamax supplemented with 2% horse serum (ThermoFisher)). On day 4, the hiPSC-derived MNs were thawed and plated at a density of 8.000 cells per well in N2B27 medium supplemented by brain-derived neurotrophic factor (BDNF, 10 ng/mL, Peprotech), glial-derived neurotrophic factor (GDNF, 10 ng/mL, Peprotech), N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT, 10  $\mu$ M, Tocris) and Y-27632 (10  $\mu$ M, Stemcell). Cultures have been maintained up to 11 days which correspond to 4 days of myogenic differentiation and 7 days of co-culture with hiPSC-derived MNs.

### **Treatment of motor neuron cultures with compounds**

To analyze the effect of compounds, MN progenitors were plated into poly-l-ornithine/laminin-treated 384-well plates at 3.000 cells per well in N2B27 medium without growth factors. After 4 days of differentiation, "early" spinal MNs were treated with the different compounds by using the Bravo Automated Liquid Handling Platform (Agilent Technologies). Cells were treated every 3 days for the next 10 days. A solution of 0.1% DMSO (MilliporeSigma) was used as a negative control. After 10 days, the cell viability was quantified.

### **Immunostaining**

After fixation with 4% paraformaldehyde (PFA)(Electron Microscopy Sciences) for 7 min at room temperature, cells were incubated overnight at 4°C with primary antibodies (listed in Table 3). The cells were washed 3 times in PBS buffer and incubated for 1 h at room temperature with appropriate Alexa fluorescent-labeled secondary antibodies (Invitrogen, 1:1 000) and Hoechst (5  $\mu$ g/mL).

### **FastLane quantification of SMN mRNA expression**

*SMN* mRNA expression from hiPSC-derived MNs treated in 384-well plates was performed using FastLane Cell probe Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Briefly, cells were washed and lysed with Fastlane's reagents. Without RNA purification step, cell lysates were used directly as templates in real-time one-step reverse transcription PCR using the QuantiTect Probe from FastLane kit combined with specific primers of endogenous control primer set, *18S*, and two *SMN* primer sets, SMN-FL (designed to amplify SMN transcript containing exon 7) and SMN- $\Delta$ 7 (designed to amplify SMN transcript lacking exon 7). The sequences of the SMN-FL primer set (spanning exons 6, 7, and 8) were forward 5'-CAAAAAGAAGGAAGGTGCTCACATT-3', reverse 5'-GTGTCATTTAGTGCTGCTCTATGC-3', and probe 5'-FAM-CAGCATTTCTCCTTAATTTA-NFQ-3' and the sequences of the SMN- $\Delta$ 7 (spanning the exon 6-8 junction) were forward 5'-CATGGTACATGAGTGGCTATCATACTG-3', reverse 5'-TGGTGTCATTTAGTGCTGCTCTATG-3', and probe 5'-FAM-CCAGCATTTCCATATAATAGC-NFQ-3'. Fold change variations induced by compound treatments were calculated using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method with DMSO-treated control cells as reference sample and *18S* housekeeping gene as reference gene.

### **HTRF Assay to quantify SMN protein expression**

SMN protein was also quantified using Homogeneous Time Resolved Fluorescence

(HTRF, Cisbio Bioassays) according to the manufacturer's protocol. This technology allows the detection and quantification of SMN protein in 384 well plate format. For this, cells were lysed in 15  $\mu$ L of lysate buffer and 10  $\mu$ L of cell lysate were transferred to a 384-well small volume white plate containing 5  $\mu$ L of the antibody solution (1:100 dilution of anti-SMN d2 and anti-SMN cryptate) (Cisbio). The plate was incubated overnight at room temperature. Fluorescence was measured at 665 nm and 620 nm on a CLARIOstar microplate reader (BMG Labtech). Ratio values of (665 nm emission/620 nm emission)  $\times$  10 000 were used to calculate  $\Delta F$  (%) according to the following equation:

$$\Delta F (\%) = [(\text{Sample ratio} - \text{Negative control ratio}) / \text{Negative control ratio}] \times 100.$$

### **Image acquisition and analysis**

Image acquisitions were performed using the automated imaging Cell Insight CX7 HCS Platform (Cellomics Inc). Masks and algorithms were developed with the HCS Reader software for automated quantification of the percentage of cells stained for ISL1, compared to the total number of cells. Co-culture images were acquired using Spinning Disk microscopy (Zeiss) with 20X objective. Each image was taken with z-stack and an orthogonal view was performed on Fiji Software. By using Fiji software, AChR clustering were quantified by manually measuring the total area as well as the mean size of AChR clusters (Tahraoui et al., 2022 – submitted). Islet1 quantification was determined by automatically counting the number of Islet1-positive cells by micropattern. Myotube area was quantified by using Fiji Software to quantify total area of cells stained by MF20 antibody per micropattern.

### **Animal model and genotyping**

To evaluate the effect of moxifloxacin *in vivo*, we used delta 7 mice (Stock No. 005025; Jackson Lab, Bar Harbor, ME, USA) as a murine model of SMA type II (SMA intermediate form). Animals had free access to food and water, and were kept into regular cages under 12/12-h light/dark cycle. All efforts were made to minimize the number of animals used and the suffering levels. The animals were genotyped at P0-1 by PCR assays (50), performed on DNA extracted from the tail, to assess the presence of the two human transgenes (SMN2 and SMN $\Delta$ 7) and the three possible genotypic variants of the Smn locus mice (Smn $^{+/+}$ , Smn $^{+/-}$  or Smn $^{-/-}$ ), according to (51). Data were obtained from tissues harvested from delta 7 mice, sacrificed at P12. An additional group of animals was used for survival analysis. A total of 82 delta 7 mice were used.

### **Moxifloxacin or vehicle administration**

SMA animals were divided into two groups: Vehicle (VHL, 2% DMSO in NaCl 0.9% solution) and moxifloxacin (75 mg/kg; moxifloxacin hydrochloride, BAY 12-8039, MedChemExpress, NJ, USA). The animals were daily injected, subcutaneously, starting from P2 to P12 (or until sacrifice for the animals involved in the survival study) with VHL or moxifloxacin (range of injected volume: 1–48  $\mu$ L, depending on age and body weight). The animals subjected to survival analysis (VHL n=23; moxifloxacin n=12) were sacrificed for humanitarian endpoints if and when they exhibited excessive weight loss (greater than  $21 \pm 5\%$ ) associated with severe neurological/motor symptoms.

### **Weight assessment and behavioural tests**

Weight and motor performance assessment was performed daily, from P2/P4 (depending on the test) to P12 on both treated mice groups (VHL n=21; moxifloxacin n=9). Before starting the tests, the mice were moved in a room (with low light or no noise); between the different trials, the pups were maintained on a heated pad (at a controlled temperature of 37°C) until the end of the tests. All pups were then returned to maternal care after handling. Delta 7 mice were first weighed and then from P2 underwent the following motor tests: Tail suspension, Righting reflex, Hindlimb suspension, Negative geotaxis (the latter was used from P4), specifically designed for SMA pups (described in detail in 19). In particular, for the hindlimb suspension test, we only evaluated the hindlimb posture by assigning a score, according to 19.

### **Animal sacrifice, tissue collection and processing**

For immunoblotting analysis, five animals for each group (VHL n=5, moxifloxacin n=5) were sacrificed by cervical dislocation at age P12: the whole spinal cord and skeletal muscles (quadriceps, gastrocnemius and diaphragm) were harvested, rapidly frozen in liquid nitrogen and then stored at -80°C.

For histochemical (Nissl staining) and immunohistochemical analysis, at P12 a number of delta 7 mice (VHL n=4, moxifloxacin n=4) were anesthetized by gaseous anaesthesia (3% isoflurane vaporized in O<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>O 50:50) and perfused transcardially with 4% buffered PFA, pH 7.4. Then, spinal cord lumbar tract and skeletal muscles (quadriceps and gastrocnemius) were dissected, postfixed in 4% PFA for 2 h and incubated overnight in 30% sucrose in 0.1 M phosphate buffer solution. Next, samples were embedded and frozen in cryostat medium (Killik, Bio-Optica): the spinal cord samples were cut into transverse 40 µm thick free-floating sections and stored at 20°C in an antifreeze solution (30% ethylene glycol, 30% glycerol, 10% PB; 189 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 192.5 mM NaOH; pH 7.4), while the muscle samples were cut longitudinally in 30 µm thick slices, directly on 4% gelatin-coated slides, which were air-dried overnight and then stored at -20°C.

For additional histological analysis [haematoxylin/eosin (H/E)], a group of treated delta 7 mice (VHL n=4, moxifloxacin n=4) were sacrificed by cervical dislocation at P12, then quadriceps and gastrocnemius skeletal muscles were harvested, embedded in cryostat medium and frozen (Killik). Skeletal muscles were next cut into transverse 30 µm thick slices, collected directly on 4% gelatin-coated slides, which were air-dried overnight and then stored at -20°C.

### **Western blot analysis**

For the analysis of the expression of SMN protein by Western blot (WB), spinal cord and skeletal muscle samples were homogenized on ice using a pestle homogenizer in radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA lysis buffer) (Merck Life Sciences) supplemented with 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 2 mM sodium orthovanadate (ThermoFisher Scientific) and 1x cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Merck Life Sciences). Sample homogenates were incubated on ice for 20 min before being centrifuged for the insoluble material separation at 14,000 × g for 20 min at 4 °C. Total protein concentration was assayed on supernatants using Bradford reagent (Bio-Rad). Protein denaturation was performed with NuPAGE® LDS Sample Buffer supplemented with NuPAGE® Sample Reducing Agent

(ThermoFisher Scientific), by heating at 95 °C for 5 min. SDS-PAGE and transfer were performed on 4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels and Trans-Blot® Turbo™ mini nitrocellulose membranes using a Trans-Blot® Turbo™ transfer System (Bio-Rad), respectively. Nonspecific binding sites were blocked using 5% non-fat dried milk in PBS-0.2% Tween-20 (Merck Life Sciences) (PBS-T) for 1 h at room temperature (RT) under shaking. All membranes were incubated overnight at 4 °C under shaking with SMN-antibody solution (diluted 1:2000 in 2% nonfat dried milk in PBS-T) (mouse-anti-SMN, BD Bioscience 610646) and in Vinculin-antibody solution (diluted 1:2000 in 2% nonfat dried milk in PBS-T) (Monoclonal mouse Anti-Vinculin, Clone Hvin-1, Merck Life Sciences) as loading control. HRP-conjugated secondary antibody (Goat Anti-Mouse IGG HRP, Bio-Rad) was diluted 1:10000 in 2% nonfat dried milk in PBS-T and incubated for 1 h at RT under shaking. Immunolabeling was detected with Clarity™ Western ECL Blotting Substrates (Bio-Rad) using the ChemiDoc™ imaging system (Bio-Rad).

For immunoblotting analysis of SMN protein levels in SMA tissues, the densitometric quantitation of bands intensity for the SMN protein levels was calculated with reference to Vinculin protein levels (used as loading control), using the Fiji software (Image J, NIH).

### **JESS Simple Western**

Quantification of total protein extracted from murine tissues was performed with a BCA protein assay kit (Pierce) using bovine serum albumin as standard. For the immunodetection assay in mouse tissues, the Jess Simple Western system was used to quantify SMN protein chemiluminescence (1:10; mouse-anti-SMN, BD Bioscience 610646) and normalized to total protein chemiluminescence according to the manufacturer instructions (Biotechne®:Protein Simple). The number of animals on this analysis varied from the immunoblotting experiment due to insufficient amount of some of the samples.

### **Stereological motor neuron counting**

For the histological examination of spinal cord lumbar tract, 40 µm thick sections were mounted on 4% gelatin-coated slides and Nissl-stained as previously described (23,29). The lumbar alpha MNs (tract L3-L5), with an area  $\geq 10 \mu\text{m}^2$ , were stereologically counted on serial sections (1 every 320 µm), using the Optical Fractionator technique with the StereoInvestigator software (MicroBrightField Inc.) and a computer-assisted microscope (Nikon Eclipse E600 microscope); then the MN density (reported as MN number/mm<sup>3</sup>) was obtained by the associated data analysis software NeuroExplorer (MicroBrightField). Representative images of spinal lumbar tract sections were acquired with Nikon Eclipse E600 microscope equipped with Optronics MicroFire digital camera.

### **Immunofluorescence staining and analysis on spinal cord sections**

Spinal cord sections underwent immunofluorescence staining, as previously reported (29). Sections were incubated overnight with primary antibodies (SMI32, Cleaved Caspase 3 and GFAP) and next with appropriate fluorochrome-conjugated secondary antibodies (primary and secondary antibodies are listed in Table 3), and finally with 4', 6 Diamino-2 phenylindole Dilactate (DAPI; 1:200; D9564-10MG, Sigma-Aldrich). Samples were washed and coverslips were mounted with anti-fade mounting medium Mowiol. Immunofluorescence analyses were

performed with a Leica TCS SP5 confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems). The Cleaved Caspase 3-positive cells were quantified in the ventral horns of the lumbar spinal cord tract (the congruent region for analysis was confirmed by the presence of SMI32-stained MNs) by counting the percentage of Cleaved Caspase 3/number of DAPI-labelled nuclei, using confocal images (40X magnification, 0.5  $\mu$ m z-step size, 14  $\mu$ m z-volume, acquisition speed 100 Hz, format 1024x1024 pixels). Four animals were analysed for each group, four spinal cord slices were evaluated for each animal.

For the analysis of the astrogliosis, four animals were analysed for each group, six fields for each animal of the spinal cord ventral horns of GFAP-positive cells were acquired by confocal (40X objective, 0.5  $\mu$ m z-step size, 14  $\mu$ m z-volume, acquisition speed 100 Hz, format 1024x1024 pixels), and then converted in black and white images: the density of immunopositive profiles was quantified by using the Fiji software.

### **Immunofluorescence staining on skeletal muscle sections and NMJ analysis**

After rapid rehydration in PBS, skeletal muscle sections on 4% gelatin-coated slices were stained for NMJ detection. First, the sections underwent antigen retrieval by sequential incubations with 1% SDS (5 min, RT) and sodium citrate solution heated to 95°C (pH 6, for 7-10 min). Subsequently, non-specific binding sites were blocked using 4% BSA solution, 4% foetal bovine serum and PBS-0.1% Triton-X for 1:30 h, RT. The sections were incubated overnight with the primary antibody (against Neurofilament 145 kDA, listed in Table 3) diluted in the blocking solution for 24 h at 4 ° C. The sections were subsequently incubated with appropriate fluorochrome-conjugated secondary antibody (listed in Table 3) (1:30 h, RT) and with  $\alpha$ -bungarotoxin (BTX) conjugated with Alexafluor-555 (1:500; 11554187, Invitrogen) diluted in 4% BSA and PBS-0.1% Triton-X (1:30 h, RT). Finally, slices were incubated with DAPI in PBS 1X for 3 min and then coverslipped with anti-fade mounting medium. Images were acquired with a Leica TCS SP5 confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems). For the analysis of NMJ area and perforation (30-50 NMJs for animal), confocal stacks of quadriceps and gastrocnemius longitudinal sections (40X objective, 0.7  $\mu$ m z-step size, 20  $\mu$ m z-volume, acquisition speed 100 Hz, format 1024x1024) were analysed with Fiji (Image J, NIH). For NMJ innervation analysis (at least 50 NMJs for animal), the presence and number of NF-positive fibers reaching each NMJ was evaluated and counted with computer-assisted microscope (Nikon Eclipse E600 microscope) to classify the NMJs as mono-innervated, multi-innervated or denervated.

### **Histological analysis of skeletal muscle atrophy**

For the morphological analysis of skeletal muscles, the quadriceps and gastrocnemius sections were stained with H/E, as previously described (23,29). To morphologically evaluate mean fiber area, perimeter, minimum and maximum Feret's diameter, more than 100 fibers for each animal were drawn with NeuroLucida software (MicroBrightField Inc.) and a computer-assisted microscope (Nikon Eclipse E600 microscope). Data were obtained by the associated data analysis software NeuroExplorer (MicroBrightField): we then averaged the means obtained from single animals. Representative images of skeletal muscles fibers were acquired with Zeiss Axioscan Z.1 digital slide scanner microscope (Carl Zeiss AG).

## Statistical Analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad software, San Diego, CA, USA). Unpaired two-tailed Student's t-test was used to compare data between two groups (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ). One-way analysis of variance (ANOVA) was performed to compare data among three or more groups, followed by a post-hoc Tukey's multiple comparison test. Values of  $p < 0.05$  were considered as statistically significant (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

Weight and motor behavioural test data were evaluated by ordinary two-way ANOVA, whose P-value for the column factor (i.e., the statistical difference between delta 7 mice groups according to treatment with VHL or moxifloxacin) was reported, followed by Sidak's post hoc multiple comparison test to analyse the difference in test results between delta 7 mice treated groups over time (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.0005$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ). In addition, in those tests expressed with not normally distributed data (i.e., righting reflex and negative geotaxis test), the contingency table analysis (Fisher's exact test) was also applied.

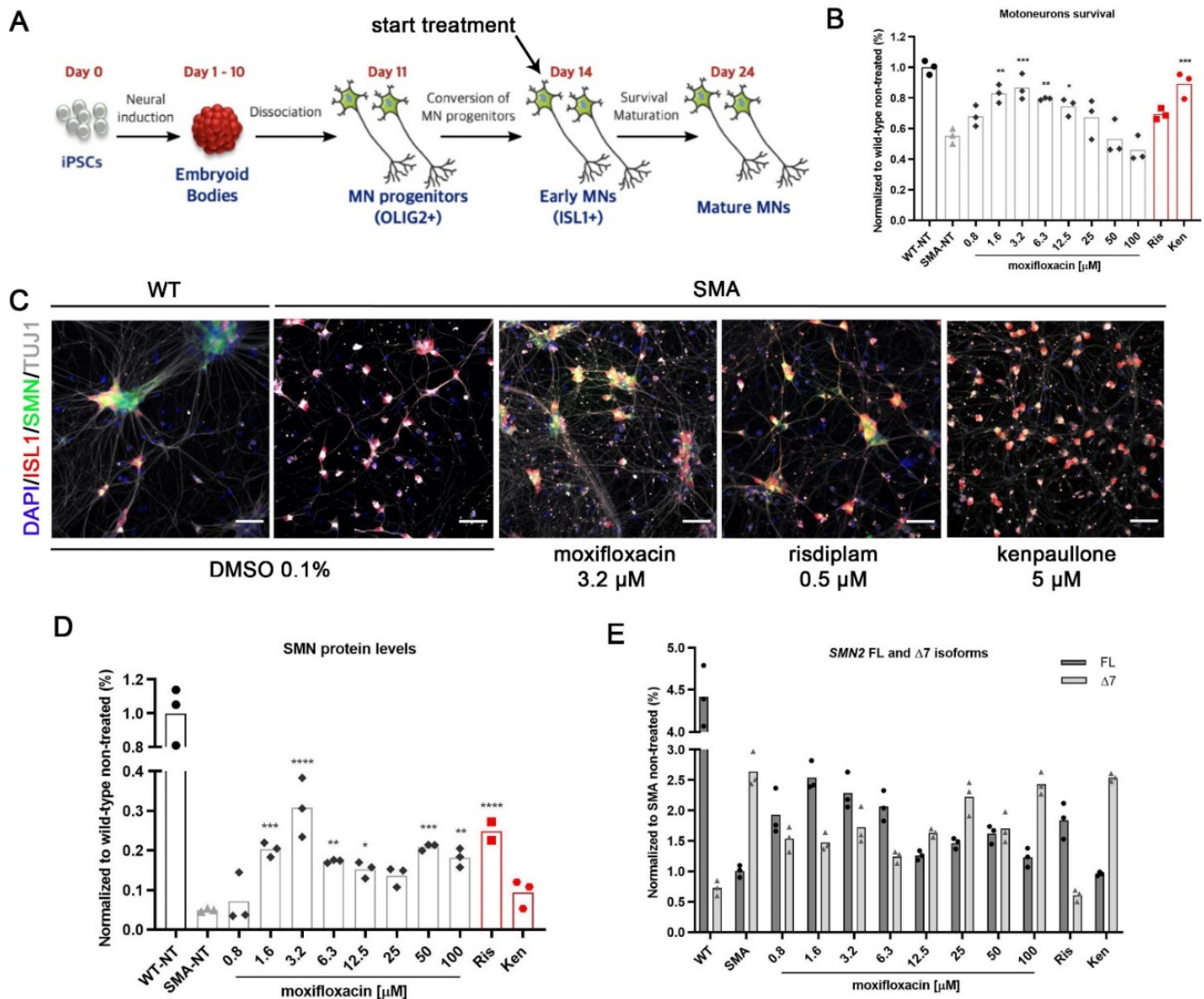
Survival assessment among the group of treated delta 7 mice was performed using the Kaplan-Meier test with Logrank (Mantel-Cox) as a post hoc test, suggested as being more sensitive to differences at the end of the curve (19).

## Study approval

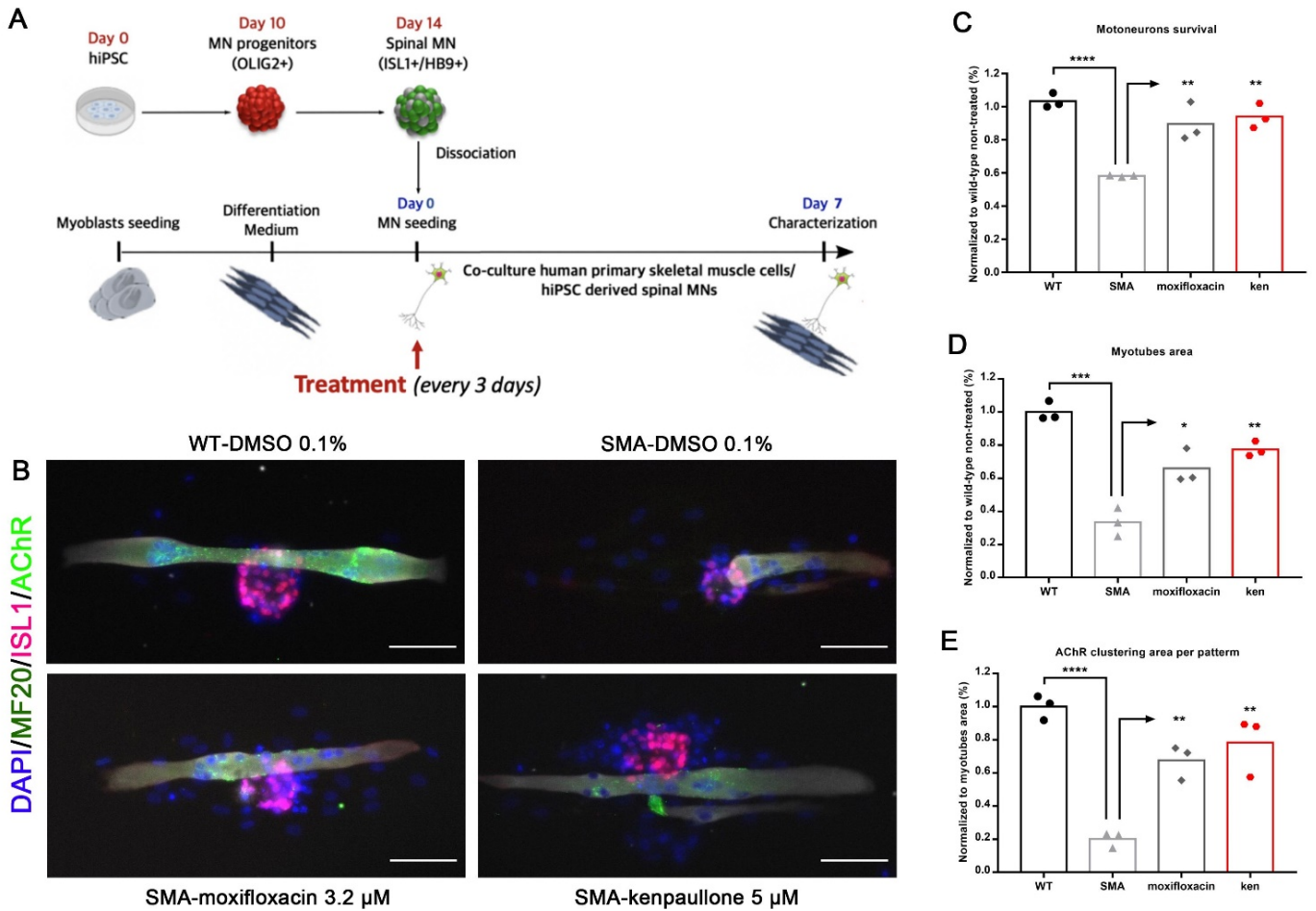
The experimental procedures involving live animals were performed in strict accordance to the European Communities Council Directive 86/609/EEC Italian Ministry of Health and University of Turin institutional guidelines on animal welfare (law 116/92 on Care and Protection of living animals undergoing experimental or other scientific procedures; permit number 980/20). Additionally, the ad hoc Ethical Committee of the University of Turin specifically approved this study.

## Acknowledgments

This work was possible by research grant "Development of combinatorial therapies for Spinal Muscular Atrophy" (22346), from the French Muscular Dystrophy Association (AFM-Téléthon) to C.M., M.B., and R.A. Part of the equipment employed in this work has been funded by Generalitat Valenciana and co-financed with ERDF funds (OP ERDF of Comunitat Valenciana 2014-2020).

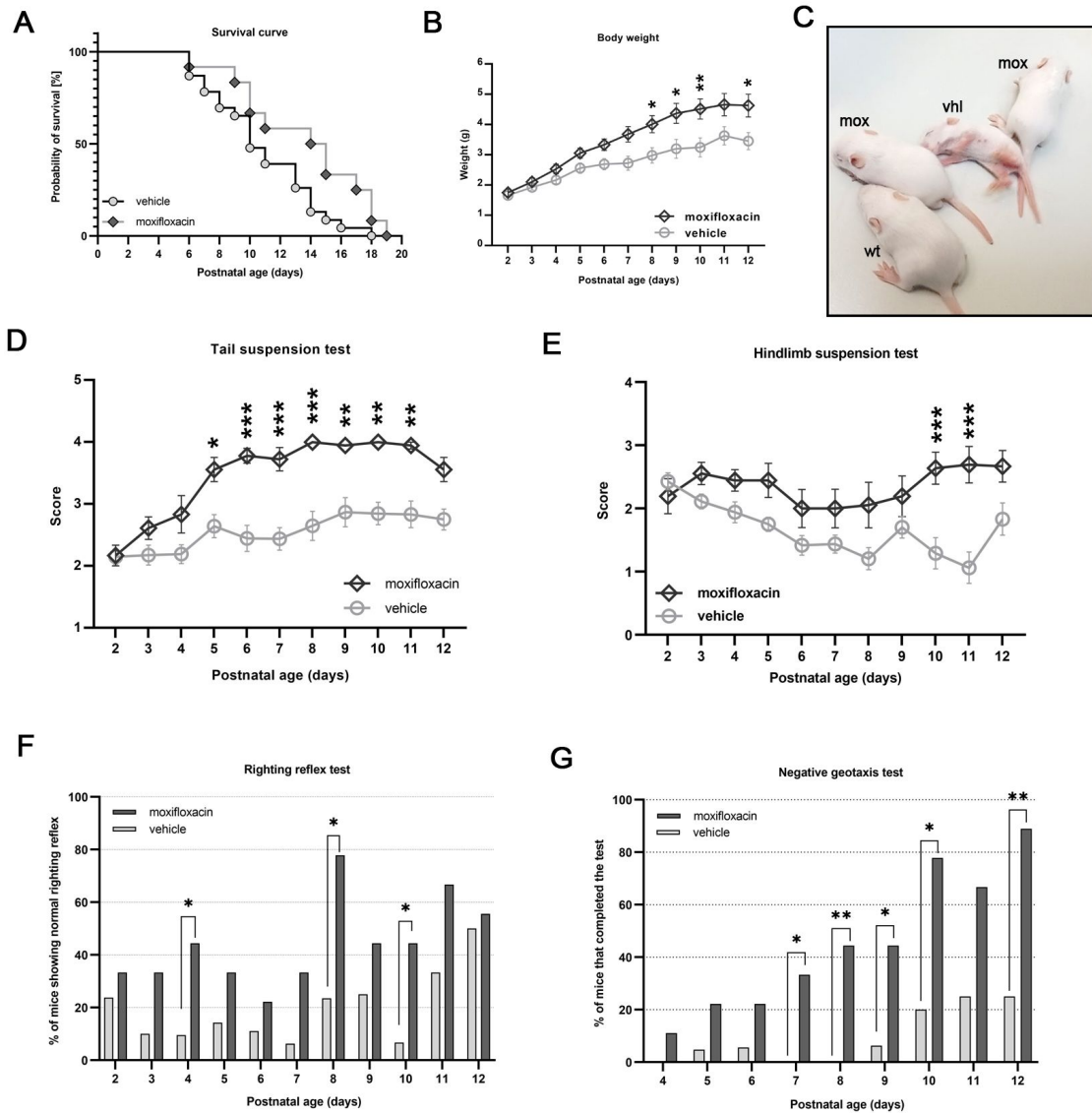


**Figure 1. Moxifloxacin increases the SMA motoneurons survival rate.** a) Schematic representation of experimental procedures on SMA and healthy motoneurons derived from induced pluripotent stem cells. b) MNs survival rate analysis after treatment with moxifloxacin for 10 days. c) Representative images of MNs stained using a neural marker (TUJ1; grey), MNs differentiation marker (ISL1; red), SMN protein (SMN; green), and cell nuclei (DAPI; blue) after treatment with moxifloxacin 3.2  $\mu$ M, kenpaullone 10  $\mu$ M, risdiplam 0.5  $\mu$ M, and solvent-treated wild type and SMA controls (DMSO 0.1%). d) SMN protein levels normalized to the wild-type cells. e) Quantitative analysis of *SMN2* FL and  $\Delta$ 7 isoforms after treatment. Data normalized to SMA non-treated cells. In all experiments kenpaullone (neuroprotective drug) at 10  $\mu$ M and risdiplam at 0.5  $\mu$ M were used as positive controls. Data represent the mean values  $\pm$  SD from 3 independent experiments using 2 independent WT and SMA hiPSC lines. Statistics were calculated using an ordinary One-Way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test ( $p > 0.05$ , ns: not significant, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

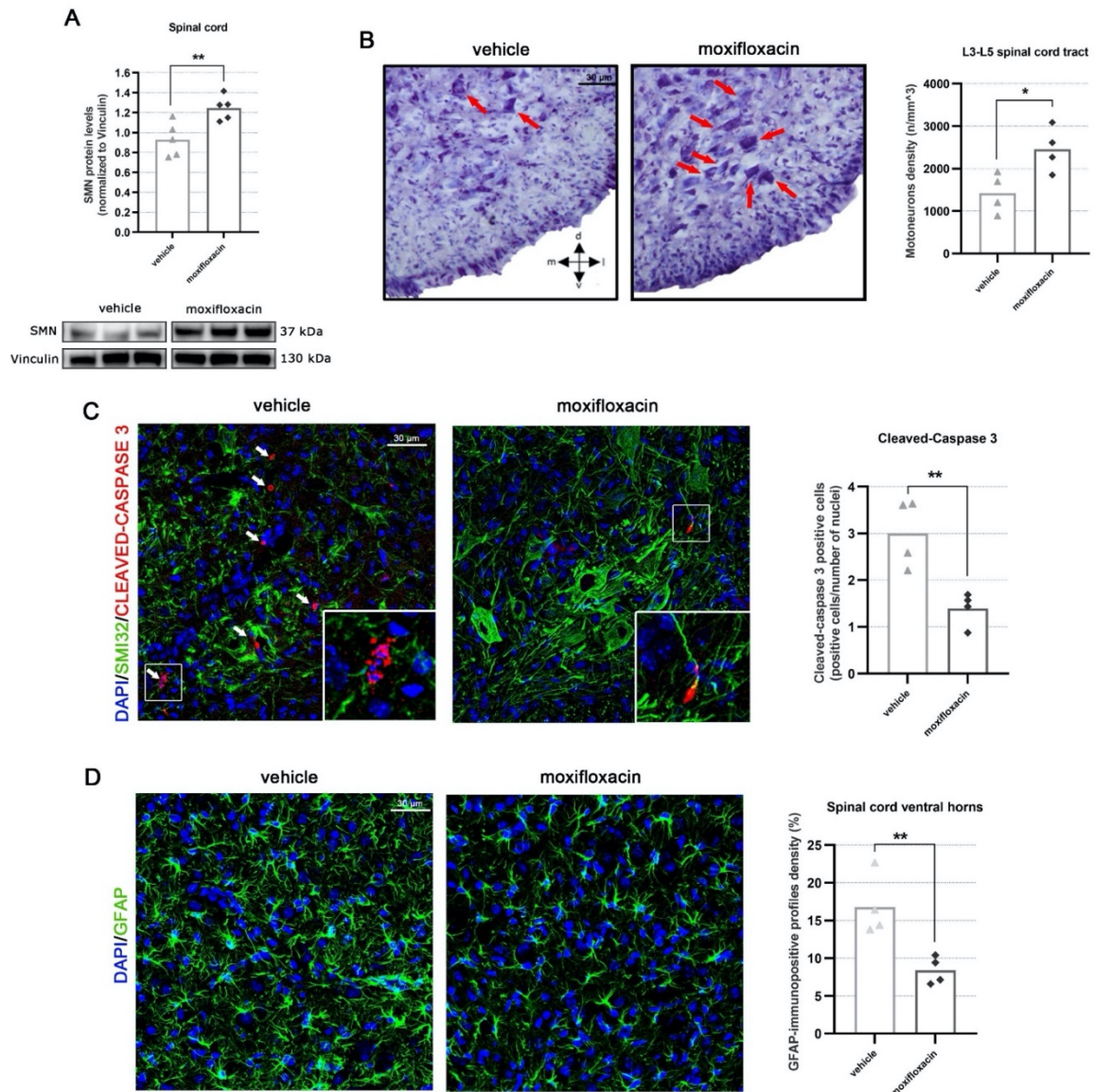


**Figure 2. Moxifloxacin increases the SMA myotube area in co-culture with SMA motoneurons.** a) Schematic representation of experimental procedures on co-culture of SMA and healthy motoneurons derived from induced pluripotent stem cells with SMA myoblasts differentiated to myotubes. b) Representative images of co-culture treated with moxifloxacin at 3.2  $\mu\text{M}$ , compared to solvent-treated wild-type and SMA cells. MNs were detected with ISL1 (red) and myotubes were marked using MF20 marker (dark green). At the post-synaptic level, acetylcholine receptor was marked with AChR (light green) and cell nuclei were stained with DAPI (blue). Kenpauillone at 10  $\mu\text{M}$  was used as a positive control. c) MNs survival rate analysis after moxifloxacin treatment compared to non-treated controls. d) Analysis of SMA myotubes area compared to the non-treated controls. e) Analysis of acetylcholine receptor clusters after treatment with moxifloxacin compared to non-treated cells. Data represent the mean values  $\pm$  SD from 3 independent experiments using 2 independent WT and SMA hiPSC lines. Statistics were calculated using an ordinary One-Way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test ( $p > 0.05$ , ns: not significant,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ ,  $****p < 0.0001$ ).

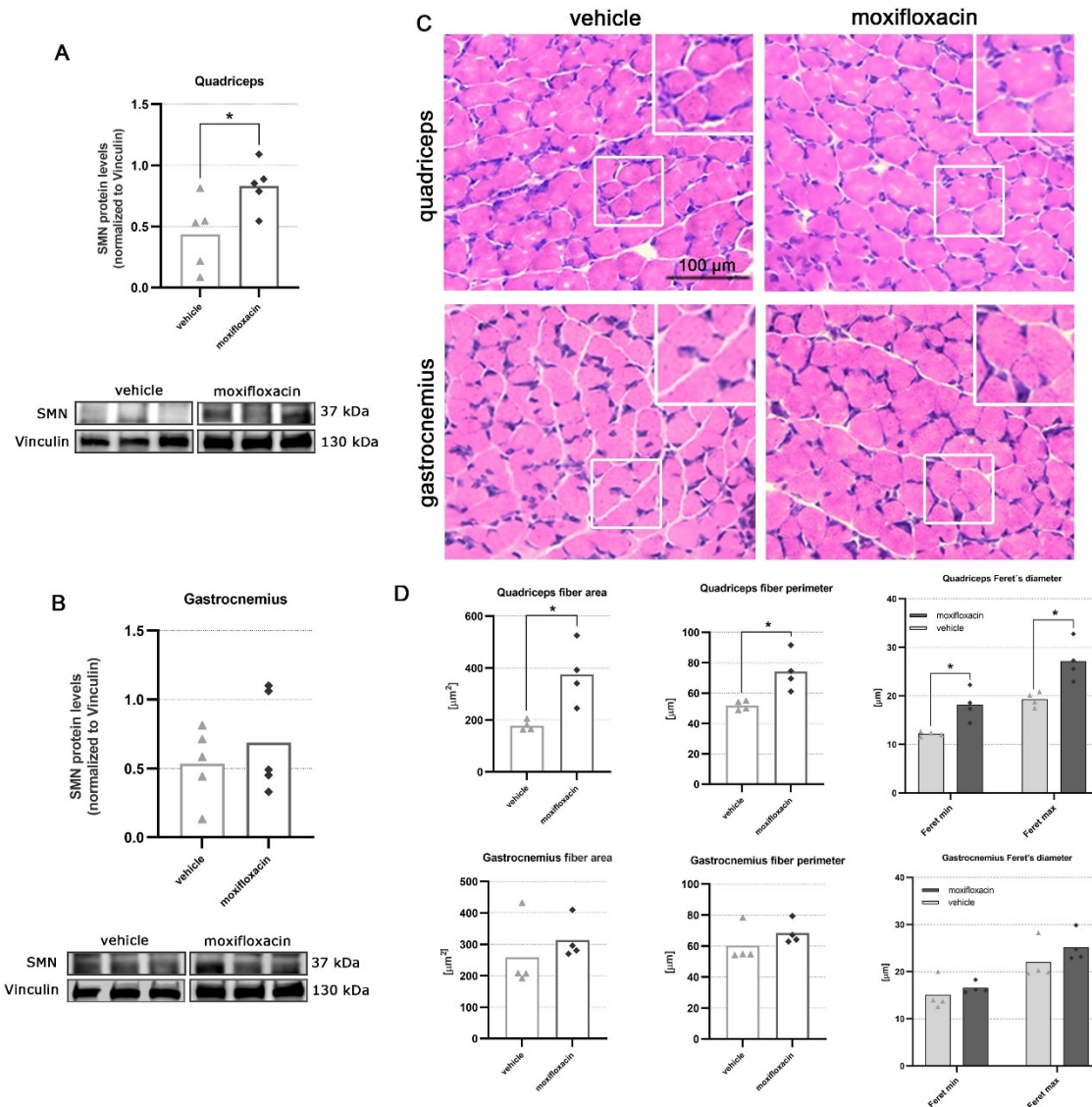




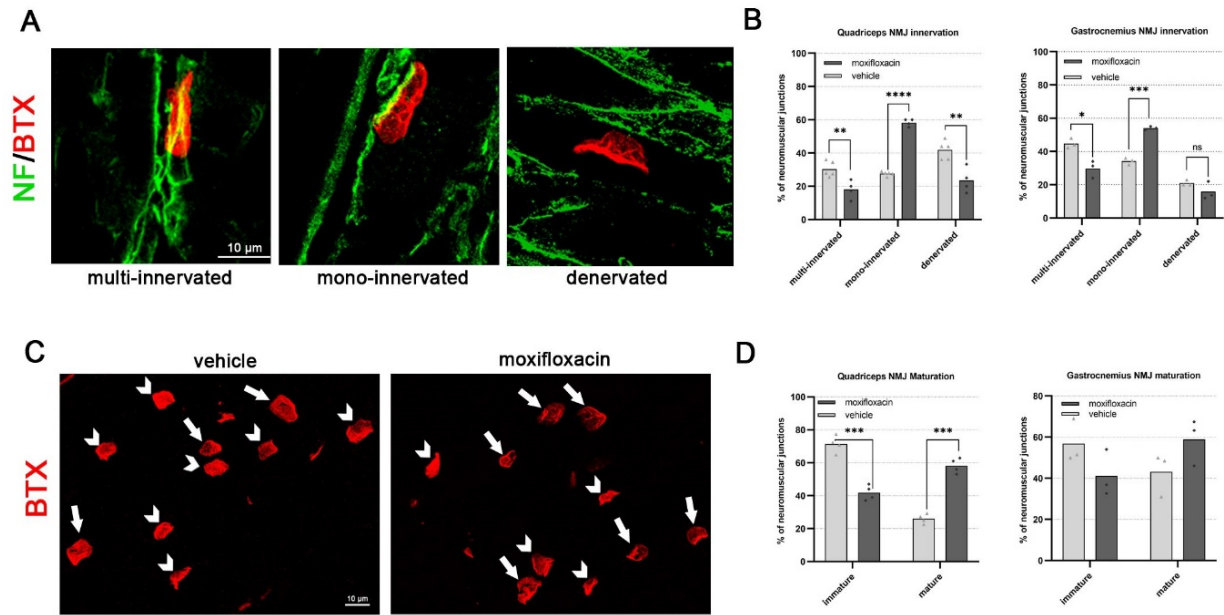
**Figure 3: The effect of moxifloxacin on the delta7 mice survival, body mass and locomotor functions.** Animals were treated daily from postnatal day 2 (P2) until sacrifice with vehicle (VHL) or moxifloxacin (75 mg/kg) by subcutaneous injections. The animals underwent behavioral motor tests and body weight assessments during this period. (A) Survival analysis in treated delta7 mice. Kaplan-Meier survival curve shows that moxifloxacin treatment can significantly extend delta 7 mice lifespan (VHL n= 23, moxifloxacin n= 12). Statistical analysis: Kaplan-Meier curve test, Log-rank Mantel Cox post hoc test. (B) Bodyweight assessment from P2 to P12. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, VHL n=21, moxifloxacin n=9; Statistical analysis: Two-way ANOVA ( $F_{(1,265)} = 51.9$ ) followed by Sidak's multiple comparison post hoc test. (C) Comparison of the external appearance of WT, and VHL and moxifloxacin (mox)-treated delta 7 mice in late disease stage. (D) Tail suspension of treated delta 7 mice. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, VHL n=21, moxifloxacin n=9, Statistical analysis: Two-way ANOVA ( $F_{(1,262)} = 114.3$ ) followed by Sidak's multiple comparison post hoc test. (E) Righting reflex of treated delta 7 mice. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, VHL n=21, moxifloxacin n=9, Statistical analysis: Fisher's exact test. (F) Hindlimb suspension score of treated delta 7 mice. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, VHL n=21, moxifloxacin n=9, Statistical analysis: Two-way ANOVA ( $F_{(1,263)} = 57.64$ ) followed by Sidak's multiple comparison post hoc test. (G) Negative geotaxis of treated delta 7 mice. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, VHL n=21, moxifloxacin n=9, Statistical analysis: Fisher's exact test.



**Figure 4: The effect of moxifloxacin on SMN protein levels, MN neurodegeneration and neuroinflammation in the spinal cord of delta 7 mice.** (A) Representative immunoblots of SMN protein levels in VHL and moxifloxacin treated delta 7 spinal cord. The intensity of the bands of the SMN protein was calculated with reference to Vinculin protein levels (used as loading control). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, n = 5 per group, Student's t-test. (B) Stereological counts of Nissl-stained lumbar alpha MNs in the spinal cord of VHL and moxifloxacin delta 7 mice. Representative images of spinal lumbar tract sections are shown. The lumbar alpha MNs (tract L3-L5), with an area  $\geq 10 \mu\text{m}^2$ , were stereologically counted and the MN density (reported as MN number/mm<sup>3</sup>) was assessed. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, n = 5 per group, Student's t-test. (C) Quantification of the percentage of Cleaved Caspase 3-positive cells in the ventral horns of the lumbar spinal cord tract (L1-L3). Representative confocal images showing the ventral horn of the lumbar spinal tract, where the SMI32-positive MNs are located. The percentage of Cleaved Caspase 3-positive cells was calculated using confocal images on the total number of DAPI-labelled nuclei in ventral horns. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, n = 4 per group, Student's t-test. (D) Evaluation of reactive astrogliosis (GFAP-positive signal) in the ventral horns of the lumbar spinal cord tract (L1-L3), showed in representative confocal images. The semiquantitative analysis of the GFAP-immunopositive profiles density (expressed as a percentage) displays a reduction of the astrogliosis in moxifloxacin delta 7 mice compared to the VHL group. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, n = 4 per group, Student's t-test.



**Figure 5: The effect of moxifloxacin on SMN protein levels and muscular fiber morphology in the skeletal muscles of delta 7 mice.** Representative immunoblots of SMN protein levels in VHL and moxifloxacin treated quadriceps (A) and gastrocnemius (B). For each tissue analysis, the intensity of the bands of the SMN protein was calculated by referring to Vinculin protein levels (used as loading control). Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, n = 5 per group, Student's t-test. (C) Comparison of muscular fiber morphology between VHL and moxifloxacin delta 7 mice at P12 of the indicated muscles. Images are representative of H/E-stained muscle sections. (D) For each sample, the measures of the muscle fiber area, the perimeter and the maximum and minimum Feret's diameter of the muscle fibers of the VHL and moxifloxacin delta 7 mice are reported. At least 100 fibers were analyzed from each animal; the results are shown as the averages obtained from the individual animals. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, n = 4 per group, Student's t-test.



**Figure 6: NMJ innervation and maturation comparison between VHL and moxifloxacin delta 7 mice at P12.** (A) Double immunostaining against BTX (red) and NF (green) is employed to analyze the plaque innervation: representative confocal images of mono-innervated, multi-innervated, and denervated NMJs are shown. Scale bar = 10  $\mu$ m. (B) Quantification of the percentage of mono-innervated, multi-innervated, and denervated NMJs in quadriceps and gastrocnemius samples of VHL and moxifloxacin delta 7 mice. (C) Representative confocal images (on the left) showing NMJ maturation, evaluated by BTX-immunostaining: the endplates are classified as immature (no perforations, indicated by triangle arrows) and mature (i.e., showing perforations, indicated by arrows). Scale bar = 10  $\mu$ m. (D) The percentage of NMJ maturation was evaluated in quadriceps and gastrocnemius of VHL and moxifloxacin delta 7 mice: data are expressed as mean  $\pm$  SEM, n = 4 per group, Student's t-test: \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.005, \*\*\*\* p<0.001.

**TABLE 1:** Analysis of quadriceps fiber area, perimeter and Feret's diameters in VHL and moxifloxacin treated delta 7 mice.

	<b>VHL</b>	<b>MOXIFLOXACIN</b>	<b>Student's t-test</b>
<b>Area (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	177.50 $\pm$ 9.65	375.9 $\pm$ 58.41	p= 0.015*
<b>Perimeter (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	51.70 $\pm$ 1.54	74.17 $\pm$ 6.44	p= 0.015*
<b>Min Feret's Diameter</b>	12.16 $\pm$ 0.23	18.15 $\pm$ 1.62	p=0.010*
<b>Max Feret's Diameter</b>	20.94 $\pm$ 0.89	30.08 $\pm$ 2.78	p=0.020*

**TABLE 2:** Analysis of gastrocnemius fiber area, perimeter and Feret's diameters in VHL and moxifloxacin treated delta 7 mice.

	<b>VHL</b>	<b>MOXIFLOXACIN</b>	<b>Student's t-test</b>
<b>Area (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	259.10 $\pm$ 57.54	314.00 $\pm$ 32.41	p= 0.437
<b>Perimeter (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	60.32 $\pm$ 5.95	68.35 $\pm$ 3.74	p= 0.296
<b>Min Feret's Diameter</b>	15.07 $\pm$ 1.68	16.56 $\pm$ 0.59	p=0.433
<b>Max Feret's Diameter</b>	22.04 $\pm$ 2.08	25.20 $\pm$ 1.62	p=0.270

**TABLE 3:** List of primary and secondary antibodies used in immunofluorescence and immunocytochemistry experiments.

Model	Antibodies	Designation	Reference	Host	Provider	Dilution	
Motoneurons	Primary	Islet1	AF1837	Goat	R&D systems	1:500	
		Tubulin $\beta$ III (Tuj1)	801201	Mouse	Biolegend	1:1000	
		Tubulin $\beta$ III (Tuj1)	PRB-435P	Rabbit	Biolegend	1:1000	
		Myosin Heavy Chain (MF20)	MF20	Mouse	DSHB	1:200	
		Acetylcholine receptor (AChR)	mAB 35	Rat	DSHB	1:350	
		SMN	Sc-32313	Mouse	Santa Cruz Biotechnology	1:200	
	Secondary	Donkey anti-mouse IgG(H+L) alexa fluor 488	A-21202			Thermo Fisher Scientific	1:1000
		Donkey anti-mouse IgG(H+L) alexa fluor 647	A-31571			Thermo Fisher Scientific	1:1000
		Donkey anti-goat IgG(H+L) alexa fluor 568	A-11057			Thermo Fisher Scientific	1:1000
		Donkey anti-rabbit IgG(H+L) alexa fluor 647	A-31573			Thermo Fisher Scientific	1:1000
Donkey anti-rat IgG(H+L) alexa fluor 488		A-21208			Thermo Fisher Scientific	1:1000	
SMA delta 7 mice	Primary	Neurofilament H (NF-H) SMI32	801702	Mouse	BioLegend	1:1000	
		Cleaved Caspase 3 (Asp175)	9661	Rabbit	Cell Signaling Technology	1:400	
		Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	Z0334	Rabbit	DAKO Cytomation	1:500	
		Neurofilament 145 kDa Antibody, CT, clone 3H11	MAB1621	Mouse	Sigma-Aldrich	1:100	
	Secondary	Cy <sup>TM</sup> 2 AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	AB_2340826			Jackson ImmunoResearch	1:400
		Cy <sup>TM</sup> 2 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	AB_2340612			Jackson ImmunoResearch	1:400
		Cy <sup>TM</sup> 3 AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	AB_2340813			Jackson ImmunoResearch	1:400
		Cy <sup>TM</sup> 3 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	AB_2307443			Jackson ImmunoResearch	1:400

## REFERENCES

1. Wirth B, Karakaya M, Kye MJ, Mendoza-Ferreira N. Twenty-Five Years of Spinal Muscular Atrophy Research: From Phenotype to Genotype to Therapy, and What Comes Next. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* 2020;21(1):231–261.
2. Shababi M, Lorson CL, Rudnik-Schoneborn SS. Spinal muscular atrophy: a motor neuron disorder or a multi-organ disease?. *Journal of anatomy* 2014;224(1):15–28.
3. Kim J-K et al. Muscle-specific SMN reduction reveals motor neuron-independent disease in spinal muscular atrophy models. *The Journal of Clinical Investigation* 2020;130(3):1271–1287.
4. Martinez-Hernandez R, Bernal S, Alias L, Tizzano EF. Abnormalities in early markers of muscle involvement support a delay in myogenesis in spinal muscular atrophy. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2014;73(6):559–67.
5. Monani UR et al. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Human molecular genetics* 1999;8(7):1177–83.
6. Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96(11):6307–11.
7. Wadman RI et al. Association of motor milestones, SMN2 copy and outcome in spinal muscular atrophy types 0-4. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* [published online ahead of print: January 20, 2017]; doi:10.1136/jnnp-2016-314292
8. Mercuri E, Pera MC, Scoto M, Finkel R, Muntoni F. Spinal muscular atrophy — insights and challenges in the treatment era. *Nat Rev Neurol* 2020;16(12):706–715.
9. Vandamme C, Adjali O, Mingozzi F. Unraveling the Complex Story of Immune Responses to AAV Vectors Trial After Trial. *Human Gene Therapy* 2017;28(11):1061–1074.
10. Labianca L, Weinstein SL. Scoliosis and spinal muscular atrophy in the new world of medical therapy: providing lumbar access for intrathecal treatment in patients previously treated or undergoing spinal instrumentation and fusion. *Journal of Pediatric Orthopaedics B* 2019;28(4):393–396.
11. Landfeldt E, Pechmann A, McMillan HJ, Lochmüller H, Sejersen T. Costs of Illness of Spinal Muscular Atrophy: A Systematic Review [Internet]. *Appl Health Econ Health Policy* [published online ahead of print: February 12, 2021]; doi:10.1007/s40258-020-00624-2
12. Menduti G, Rasà DM, Stanga S, Boido M. Drug Screening and Drug Repositioning as Promising Therapeutic Approaches for Spinal Muscular Atrophy Treatment. *Front. Pharmacol.* 2020;11:592234.
13. Lukas T, Siddique T. Cancer Drug Repurposing for Treating Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) (S5.004). *Neurology* 2019;92(15 Supplement):S5.004.
14. Konieczny P, Artero R. Drosophila SMN2 minigene reporter model identifies moxifloxacin as a candidate therapy for SMA. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2020;34(2):3021–3036.
15. Maury Y et al. Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes. *Nat Biotechnol* 2015;33(1):89–96.
16. Boido M, Vercelli A. Neuromuscular Junctions as Key Contributors and Therapeutic Targets in Spinal Muscular Atrophy [Internet]. *Front. Neuroanat.* 2016;10. doi:10.3389/fnana.2016.00006
17. Young J et al. MyoScreen, a High-Throughput Phenotypic Screening Platform Enabling Muscle Drug Discovery. *SLAS DISCOVERY: Advancing the Science of Drug Discovery* 2018;23(8):790–806.
18. Le TT et al. SMN $\Delta$ 7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. *Human Molecular Genetics* 2005;14(6):845–857.



19. El-Khodor BF et al. Identification of a battery of tests for drug candidate evaluation in the SMNΔ7 neonate model of spinal muscular atrophy. *Experimental Neurology* 2008;212(1):29–43.
20. Piras A et al. Inhibition of autophagy delays motoneuron degeneration and extends lifespan in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Cell Death Dis* 2017;8(12):3223.
21. Rindt H et al. Astrocytes influence the severity of spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics* 2015;24(14):4094–4102.
22. Bolliger MF et al. Specific proteolytic cleavage of agrin regulates maturation of the neuromuscular junction. *Journal of Cell Science* 2010;123(22):3944–3955.
23. Boido M et al. Increasing Agrin Function Antagonizes Muscle Atrophy and Motor Impairment in Spinal Muscular Atrophy. *Front. Cell. Neurosci.* 2018;12:17.
24. Solier S et al. Topoisomerase I and II inhibitors control caspase-2 pre-messenger RNA splicing in human cells. *Mol Cancer Res* 2004;2(1):53–61.
25. Fabian. Moxifloxacin enhances etoposide-induced cytotoxic, apoptotic and anti-topoisomerase II effects in a human colon carcinoma cell line [Internet]. *Int J Oncol* 2010;37(2). doi:10.3892/ijo\_00000695
26. Tsai L-K, Tsai M-S, Ting C-H, Wang S-H, Li H. Restoring Bcl-xL levels benefits a mouse model of spinal muscular atrophy. *Neurobiology of Disease* 2008;31(3):361–367.
27. Tsai MS et al. Abolishing Bax-Dependent Apoptosis Shows Beneficial Effects on Spinal Muscular Atrophy Model Mice. *Molecular Therapy* 2006;13(6):1149–1155.
28. Garcera A et al. A new model to study spinal muscular atrophy: Neurite degeneration and cell death is counteracted by BCL-XL Overexpression in motoneurons. *Neurobiology of Disease* 2011;42(3):415–426.
29. Schellino R, Boido M, Borsello T, Vercelli A. Pharmacological c-Jun NH2-Terminal Kinase (JNK) Pathway Inhibition Reduces Severity of Spinal Muscular Atrophy Disease in Mice. *Front. Mol. Neurosci.* 2018;11:308.
30. Guadagno J, Xu X, Karajgikar M, Brown A, Cregan SP. Microglia-derived TNF $\alpha$  induces apoptosis in neural precursor cells via transcriptional activation of the Bcl-2 family member Puma. *Cell Death Dis* 2013;4(3):e538–e538.
31. Heckmann BL, Tummers B, Green DR. Crashing the computer: apoptosis vs. necroptosis in neuroinflammation. *Cell Death Differ* 2019;26(1):41–52.
32. Semmler A, Okulla T, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Heneka MT. Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 2005;30(2–3):144–157.
33. Zhou C, Feng Z, Ko C-P. Defects in Motoneuron–Astrocyte Interactions in Spinal Muscular Atrophy. *J. Neurosci.* 2016;36(8):2543–2553.
34. Abati E, Citterio G, Bresolin N, Comi GP, Corti S. Glial cells involvement in spinal muscular atrophy: Could SMA be a neuroinflammatory disease?. *Neurobiology of Disease* 2020;140:104870.
35. Barman Balfour JA, Lamb HM. Moxifloxacin: A Review of its Clinical Potential in the Management of Community-Acquired Respiratory Tract Infections. *Drugs* 2000;59(1):115–139.
36. Cheng A et al. SIRT3 Haploinsufficiency Aggravates Loss of GABAergic Interneurons and Neuronal Network Hyperexcitability in an Alzheimer’s Disease Model. *J. Neurosci.* 2020;40(3):694–709.
37. Qiu Z et al. Bidirectional effects of moxifloxacin on the pro-inflammatory response in lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages [Internet]. *Mol Med Report* [published online ahead of print: October 22, 2018]; doi:10.3892/mmr.2018.9569
38. Radtke KK et al. Moxifloxacin Pharmacokinetics, Cardiac Safety, and Dosing for the Treatment of Rifampicin-Resistant Tuberculosis in Children. *Clinical Infectious Diseases* 2021;ciab641.

39. Zusso M et al. Ciprofloxacin and levofloxacin attenuate microglia inflammatory response via TLR4/NF- $\kappa$ B pathway. *J Neuroinflammation* 2019;16(1):148.
40. Kellermann K et al. Perioperative moxifloxacin treatment in rats subjected to deep hypothermic circulatory arrest: Reduction in cerebral inflammation but without improvement in cognitive performance. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2011;141(3):796–802.
41. d’Errico P et al. Selective Vulnerability of Spinal and Cortical Motor Neuron Subpopulations in delta7 SMA Mice. *PLoS ONE* 2013;8(12):e82654.
42. Kariya S et al. Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy. *Human Molecular Genetics* 2008;17(16):2552–2569.
43. Fralish Z, Lotz EM, Chavez T, Khodabukus A, Bursac N. Neuromuscular Development and Disease: Learning From in vitro and in vivo Models. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021;9:764732.
44. El-Khodor BF et al. Prediction of death in the SMN $\Delta$ 7 mouse model of spinal muscular atrophy: Insight into disease stage and progression. *Journal of Neuroscience Methods* 2012;209(2):259–268.
45. Servais L, Baranello G, Scoto M, Daron A, Oskoui M. Therapeutic interventions for spinal muscular atrophy: preclinical and early clinical development opportunities. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2021;30(5):519–527.
46. Mérien A et al. CRISPR gene editing in pluripotent stem cells reveals the function of MBNL proteins during human *in vitro* myogenesis. *Human Molecular Genetics* 2021;31(1):41–56.
47. Maury Y et al. Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes. *Nat Biotechnol* 2015;33(1):89–96.
48. Chaouch S et al. Immortalized skin fibroblasts expressing conditional MyoD as a renewable and reliable source of converted human muscle cells to assess therapeutic strategies for muscular dystrophies: validation of an exon-skipping approach to restore dystrophin in Duchenne muscular dystrophy cells. *Hum Gene Ther* 2009;20(7):784–790.
49. Edom F, Mouly V, Barbet JP, Fisman MY, Butler-Browne GS. Clones of human satellite cells can express in vitro both fast and slow myosin heavy chains. *Dev Biol* 1994;164(1):219–229.

## DISCUSSION & CONCLUSION

---

## DISCUSSION GENERALE

---

Les différentes études menées lors de mon doctorat ont eu pour objectif de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la SMA, en me focalisant plus particulièrement sur ceux pouvant être impliqués dans la vulnérabilité sélective des motoneurones. Au cours de ce projet, j'ai pu ainsi focaliser mes recherches sur différents aspects :

i) Dans un premier temps, j'ai pu participer au développement de modèles cellulaires humains *in vitro*, permettant de reproduire d'une part la sensibilité différentielle des motoneurones SMA, et d'autre part, évaluer l'impact de cette sensibilité différentielle sur leur communication avec la cible musculaire.

ii) Ces outils cellulaires m'ont également permis d'étudier certains mécanismes moléculaires sous-jacents à cette vulnérabilité sélective des motoneurones spinaux dans la SMA.

iii) Pour finir, je me suis également intéressée au potentiel de ces modèles cellulaires pour l'identification de nouvelles pistes thérapeutiques pharmacologiques pour la SMA.

### **1. Potentiel des hPSC pour reproduire et mieux comprendre la sensibilité différentielle des motoneurones dans les maladies neuromusculaires**

- Génération des deux principaux sous-types de motoneurones dérivés d'hPSC

Ces dernières années, des progrès considérables ont été réalisés dans le domaine des cellules souches pluripotentes permettant le développement de protocoles de différenciation sophistiqués, et d'accéder à des populations cellulaires de plus en plus spécifiques. Illustrant ces avancées, les protocoles permettant de différencier les cellules souches pluripotentes en neurones moteurs ont évolué de façon considérable. Les premiers protocoles ont été réalisés à partir de cellules souches pluripotentes de souris (mESC), où l'exposition des mESC aux voies de signalisation Sonic Hedgehog (SHH) et à l'acide rétinoïque (RA), les facteurs ventralisant et caudalisant du système nerveux central (SNC) au cours du développement, permettaient d'obtenir des cultures de motoneurones spinaux (Allodi and Hedlund 2014; Wichterle et al. 2002). Plus récemment, des sous-types de motoneurones ont pu être obtenus par la surexpression de certains facteurs de transcriptions. En effet, alors que l'expression forcée des trois facteurs de transcription, Ngn2, Isl1 et Lhx3, dans les mESC est suffisante pour programmer rapidement et efficacement l'identité des motoneurones spinaux, le remplacement de Lhx3 par Phox2a permet la génération de motoneurones craniaux (Mazzoni et al. 2013; Allodi et al. 2019; Pla et al. 2008). Illustrant ce point, Allodi et ses collègues ont récemment caractérisé ces populations distinctes de motoneurones à l'aide d'immunocytochimie, d'enregistrements électrophysiologiques et de séquençage d'ARN et ont permis de démontrer que ces motoneurones craniaux dérivés de mESC correspondait à

des neurones oculomoteurs et étaient similaires à leurs homologues chez l'homme (Allodi et al. 2019). De manière intéressante, cette population de neurones oculomoteurs correspond au sous-type de motoneurones retrouvés résistants face à la dégénérescence dans la SMA. Toutefois, ces approches de différenciation directe ont l'inconvénient de contourner les premières étapes développementales, étapes qui pourraient être primordiales dans la mise en place de pathologies. Afin de contourner ces limitations, notre groupe a identifié des conditions de culture particulières permettant de convertir des hPSC en sous-types de neurones, à savoir les motoneurones spinaux et craniaux, les interneurones spinaux et les neurones sensoriels (Maury et al. 2015). Plus récemment, le protocole permettant la génération de motoneurones spinaux a même été optimisé dans le but d'obtenir des sous-type de motoneurones spinaux plus spécifiques, allant des motoneurones cervicaux, thoracique, lombaires et sacraux (Mouilleau et al. 2021). Bien que le protocole initial ait également permis la génération de motoneurones craniaux, son efficacité était de seulement 50 % (Maury et al. 2015). Le premier objectif de mon travail de thèse a ainsi été d'optimiser ce protocole permettant de générer des motoneurones craniaux à partir d'hiPSC (Maury et al. 2015), en jouant sur les temps et concentrations de différentes cytokines. Cette optimisation nous a permis de générer des proportions plus élevées de motoneurones craniaux (70%). Nous avons donc développé des protocoles permettant de reproduire de façon robuste et reproductible les deux sous-types principaux de neurones moteurs. Ces développements représentent un intérêt pour des applications de modélisation pathologique. La vulnérabilité sélective de certains sous-types neuronaux est une caractéristique des troubles neurodégénératifs tels que la maladie de Parkinson, la sclérose latérale amyotrophique (SLA) ou SMA. Ainsi, combiner l'utilisation des hiPSC issus de patients et leur différenciation ciblée en sous-types de motoneurones présentant une sensibilité différentielle devrait améliorer leur modélisation *in vitro* et permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. L'accès relativement rapide et efficace à plusieurs sous-types de motoneurones devraient faciliter les études comparatives en condition normal ou pathologique, telles que l'évaluation de la survie neuronale, de l'arborisation neuritique, des approches de génomique et protéomique

- Développement d'un modèle humain *in vitro* de la communication entre le motoneurone et la fibre musculaire

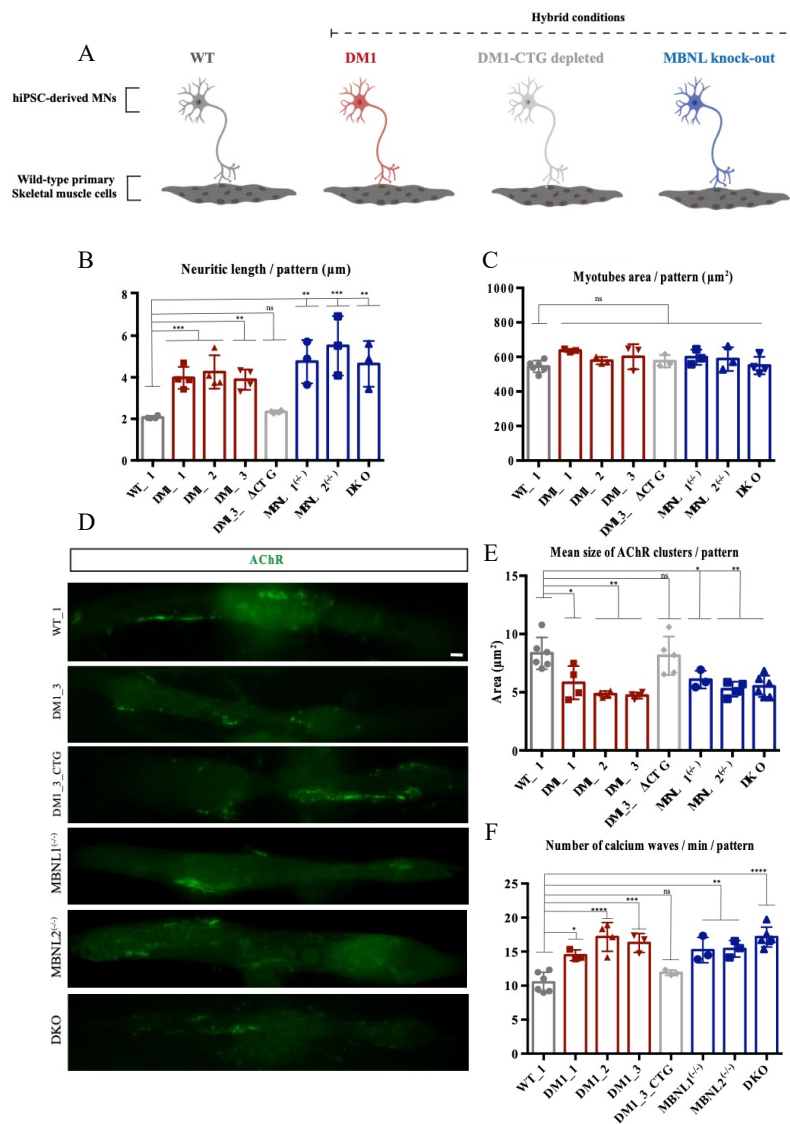
Depuis les dix dernières années, des avancées remarquables ont été réalisées dans le développement de modèles NMJ *in vitro*. Pour la SMA, de nombreuses études ont révélé la présence d'atteintes de la NMJ, avant même la mort des motoneurones (Yoshida et al. 2015; Martínez-Hernández et al. 2014). Dans le but d'étudier ces atteintes dans un modèle *in vitro* humain, nous avons développé un système de co-culture permettant d'étudier la communication entre le motoneurone et sa cible musculaire pour la modélisation de maladies neuromusculaires. Nous avons pu démontrer que ce système associant des motoneurones dérivés

de hiPSC d'une part, et des cellules musculaires primaires ou immortalisées d'autre part, était fonctionnel et adapté à l'identification de phénotypes précoces de la SMA.

Sur la base de la stratégie adoptée pour la SMA, ce même modèle d'étude a également été utilisé dans le cadre d'une autre pathologie, la dystrophie myotonique de type 1 (DM1). La DM1 a longtemps été décrite comme une maladie purement musculaire, mais il est désormais suggéré qu'une atteinte des motoneurones serait détectée. Ainsi, plusieurs études ont décrit la présence de défauts de transmission synaptiques chez les patients (Bombelli et al. 2016) ou encore l'observation de foci au niveau des noyaux des motoneurones (Wheeler et al. 2007). L'objectif de cette étude, menait par une autre étudiante en thèse au sein de l'équipe, avec laquelle j'ai pu travailler, Julie Tahraoui, était d'évaluer si la mutation DM1, et en particulier la perte de fonction des protéines *Muscleblind* (MBNL), pouvait affecter la communication entre les motoneurones spinaux et leur cible musculaire (**Figure 55**). Cela a permis de proposer un premier modèle *in vitro* de communication neuromusculaire dans le cadre de la DM1. Parmi les résultats de cette étude, le défaut d'arborisation neuritique a été retrouvé dans les motoneurones DM1 (Marteyn et al. 2011) et MBNL KO, suggérant un rôle important de ces protéines au niveau des mécanismes dérégulés dans les motoneurones DM1. Dans le but de définir si la mutation causale de la pathologie, et plus particulièrement la perte de fonction des protéines MBNL, pouvaient affecter la communication entre les motoneurones et leur cible musculaire, un modèle hybride a été utilisé avec différentes conditions de motoneurones co-cultivés en présence de cellules musculaires primaires saines. Ainsi, cette étude a pu montrer, par des analyses fonctionnelles, des altérations de la connectivité entre les deux types cellulaires, en observant notamment des défauts de clusterisation des AChR ainsi qu'une dérégulation du flux calcique dans les cellules musculaires lorsque celles-ci sont en présence de motoneurones dérivés d'hiPSC DM1 ou dérivés d'hiPSC MBNL KO, avec généralement un phénotype plus sévère dans le cas de motoneurones DKO. De façon très intéressante, l'altération de l'activité calcique dans les myotubes des systèmes hybrides DM1 et MBNL DKO est inverse par rapport aux systèmes hybrides SMA et se traduit par une augmentation du nombre de pics calciques, ce qui pourrait s'apparenter à l'hyperexcitabilité de la fibre musculaire observée chez les patients DM1.

Nous avons ainsi développé un modèle *in vitro* NMJ-like adapté à la modélisation pathologique de maladies neuromusculaires telles que SMA et DM1. Malgré ces évolutions, plusieurs défis demeurent, tels que le niveau de maturité du système, assimilé à un modèle développemental, et l'utilisation des cellules musculaires squelettiques primaires humaines, qui sont connues pour varier en fonction du donneur (Nikolić et al. 2017). Ainsi le développement d'un modèle humain dans lequel les composants neuronaux et musculaires sont dérivés du même individu est d'un grand intérêt pour la modélisation des maladies neuromusculaires génétiques. Avec le développement récent de protocoles permettant la conversion des hPSCs en cellules musculaires squelettiques (Caron et al. 2016; Pourquié et al. 2018), il est possible de réaliser des co-cultures entre motoneurones et cellules musculaires squelettiques dérivées d'hiPSC issus d'un même donneur (Demestre et al. 2015; Maffioletti et

al. 2018; Mazaleyrat et al. 2020; Osaki et al. 2018; Picchiarelli et al. 2019; Puttonen et al. 2015).



**Figure 55 : Modélisation pathologique de la Dystrophie Myotonique de type 1 (DM1) en co-culture sur support micropatterné.** A. Représentation schématique des conditions de co-culture hybrides utilisées dans l'étude. B,C. Quantification de la longueur neuritique (µm) (B) et de l'aire des myotubes (C) par pattern après 11 jours de co-culture. D,E. Images représentatives de l'immunomarquage AChR (vert) (D) et quantification de la taille moyenne par pattern des clusters AChR. Barre d'échelle : 10 µm. F. Quantification du nombre moyen d'ondes calciques enregistrées dans les cellules musculaires squelettiques primaires humaines par pattern et par minute après 11 jours de co-culture. Source : données Julie Tahraoui.

Différents sous-types de motoneurones peuvent être dérivés de hPSC et étudiés dans notre modèle de co-culture. Nous pourrions ainsi imaginer utiliser différents types de cellules musculaires dérivés de hPSC (E. Kim et al. 2020). Cependant, notre faible connaissance des programmes géniques activés lors du développement de ces sous-types de progéniteurs myogéniques limite leur transposition en protocole de différenciation *in vitro* à partir de hPSC.

L'équipe du Dr. Shahragim Tajbakhsh à l'Institut Pasteur tente de mieux comprendre ces mécanismes et a récemment publié des travaux montrant que les muscles du cou se développent indépendamment de ceux de la tête et du tronc sous le contrôle d'un programme moléculaire activé précocement lors du développement (Heude et al. 2018). Ces recherches apportent des éléments nouveaux dans la compréhension des atteintes musculaires différentielles. L'approche par l'utilisation des hPSC doit être approfondie pour déterminer la faisabilité de générer un tel niveau de spécification de nos modèles *in vitro*.

Un des enjeux majeurs concernant ces modèles *in vitro* de NMJ est le niveau de maturité obtenu (Bakooshli et al. 2019; Maffioletti et al. 2018; Osaki et al. 2018; Santhanam et al. 2018). Bien que relativement court avec une durée moyenne de 2 semaines, la durée de la co-culture est toutefois limitée par la contraction des cellules musculaires primaires sur les micropatterns provoquant un détachement du système de co-culture. Dans l'objectif de garder ces co-cultures plus longtemps, l'utilisation de nouveaux hydrogels développés récemment et plus innovants pourraient permettre d'améliorer ce point (Santoso and McCain 2020). Une autre alternative pourrait être l'utilisation de puces microfluidiques permettant de compartimenter les motoneurones d'une part, et les cellules musculaires d'autre part, sur un coating spécifique du type cellulaire (de Jongh et al. 2021; Zahavi et al. 2015). Plus récemment, un nouveau système appelé « assemloïde » pour l'assemblage des trois organoïdes générés à partir de hPSC, a montré des résultats intéressants en termes de maturité et de fonctionnalité mais la durée de culture demande plusieurs centaines de jours (Andersen et al. 2020). De plus, jusqu'à présent, l'intégration des cellules de Schwann (SCs) dans ces modèles de NMJ a été limitée en raison de contraintes techniques. En effet, l'accès et le maintien en culture des SCs primaires sont difficiles, et aujourd'hui seuls quelques protocoles de différenciation des SCs à partir des hPSC sont disponibles, dont la plupart n'offrent que de faibles rendements cellulaires, nécessitant des étapes de tri cellulaire (Huang et al. 2020; Liu et al. 2012; Ziegler et al. 2011). A ce jour, aucune étude n'a montré l'intégration spécifique de SCs dérivés de hiPSC dans un modèle de NMJ humain. Cependant, il a récemment été montré que l'inclusion de SCs dérivés de hiPSC dans des expériences de co-culture avec des motoneurones dérivés de hiPSC et des myoblastes C2C12 améliorerait la maturité de la co-culture, comme le montre la croissance accrue des myotubes ainsi que la taille et le nombre des AChR sur les myotubes (Hörner et al. 2021). Faustino Martins et ses collègues ont développé une stratégie élégante pour dériver des organoïdes neuromusculaires des hiPSC, sur une période de 50 à 100 jours (Faustino Martins et al. 2020). Ces organoïdes présentaient une morphologie allongée avec du tissu neural d'un côté et des cellules musculaires de l'autre. Dans ce système, ils ont montré l'apparition de cellules positives pour le marqueur de SCs, S100b, et ont confirmé par microscopie électronique la présence de terminaisons nerveuses présynaptiques contenant des vésicules synaptiques et des zones actives. De plus, ces NMJ étaient fonctionnels, comme en témoigne la détection de la contraction musculaire après 50 jours de culture.



## 2. Sensibilité différentielle des motoneurones et de leur connectivité avec la fibre musculaire dans la SMA

- Mise en évidence de la sensibilité différentielle des motoneurones dans les modèles animaux SMA

Les motoneurones  $\alpha$  de la corne antérieure de la moelle épinière représentent le type cellulaire le plus touché dans la SMA (Hausmanowa-Petrusewicz et al. 1968; Kariya et al. 2008; Marshall and Duchon 1975; Mentis et al. 2011; Powis and Gillingwater 2016). Toutefois, on ne sait toujours pas pourquoi ces motoneurones présentent une vulnérabilité particulière dans la SMA (Hamilton and Gillingwater 2013). De manière encore plus surprenante, il a été démontré à plusieurs reprises qu'une sensibilité différentielle existait entre des pools de motoneurones innervant des muscles distincts. En effet, la SMA se caractérise, chez le patient, par une faiblesse des muscles proximaux résultant d'une perte des motoneurones de la moelle épinière. Toutefois, certains muscles, tels que le diaphragme, le muscle buccinateur, et la langue, semblent relativement épargnés chez les patients (Kariya et al. 2008; Munsat and Davies 1992). Mieux comprendre les mécanismes régissant cette vulnérabilité sélective, dépendants de SMN ou non, offrirait le potentiel de révéler de nouvelles cibles thérapeutiques, avec une pertinence potentielle pour d'autres troubles neurodégénératifs où la vulnérabilité sélective de certains motoneurones est également présente.

Dans le but de mieux caractériser ces atteintes, différentes études se sont basées sur l'utilisation de modèles animaux SMA et particulièrement les modèles murins. Il a ainsi été montré que certains pools de motoneurones se sont particulièrement vulnérables à la dégénérescence, comme ceux innervant des muscles abdominaux, associés à des niveaux élevés de dénervation de NMJ, alors que d'autres regroupements de motoneurones chez le même animal pouvaient rester intacts, comme ceux innervant des muscles crâniens (Ling et al. 2012; Murray et al. 2008). Cette observation soutient l'hypothèse qu'un sous-ensemble de motoneurones posséderait des caractéristiques intrinsèques uniques qui les protègent ou au contraire les fragilisent (Murray et al. 2015). Ling et al., ont réalisé une analyse approfondie d'environ 20 muscles dans le modèle murin SMN $\Delta$ 7 et ont trouvé une dénervation sévère et sélective dans de nombreux muscles axiaux et plusieurs muscles appendiculaires au stade terminal de la maladie. Ces muscles étant composés de différents types de fibres musculaires et non spécifiques à un emplacement corporel, cette étude suggère que la susceptibilité à la dénervation semble attribuée aux propriétés intrinsèques de la cellule (Ling et al. 2012; Thomson et al. 2012). D'autres études, plus récentes, ont permis de confirmer ces premières observations, en décrivant à leur tour une sensibilité différentielle suivant les pools de motoneurones dans le modèle de souris SMN $\Delta$ 7 (Murray et al. 2015; Nichterwitz et al. 2020) et le modèle zebrafish SMA (Boyd et al. 2017).

A ce jour, toutes les études qui se sont intéressées à évaluer la sensibilité différentielle des motoneurones dans la SMA, se sont basés sur l'utilisation de modèles animaux SMA. Ainsi, par l'utilisation combinée des modèles de motoneurones dérivés des hPSC issus de patients SMA et contrôle, et du système de co-culture, l'objectif était d'évaluer cette sensibilité différentielle dans un modèle *in vitro* humain SMA. Cette étude nous a permis de démontrer d'une part la dégénérescence sélective des motoneurones spinaux SMA. En effet, alors que les motoneurones spinaux SMA montrent une sensibilité accrue à la dégénérescence médiée par l'apoptose à partir de 24 jours de culture, les motoneurones craniaux SMA révèlent une certaine résistance, et ce même après plusieurs semaines de culture. De façon intéressante, le modèle de co-culture SMA, en présence de motoneurones spinaux SMA, révèle des signes pathologiques au niveau de la NMJ, défauts qui apparaissent avant même le phénotype de mort sélective des motoneurones spinaux SMA. Cela se traduit par une diminution des clusters de AChR et une diminution du nombre de pics calcique. Ces résultats sont en accord avec différentes études SMA montrant des défauts de maturation des NMJ. En effet, Kariya et al., ont démontré que 50 % des NMJ sont immatures, contre 10 % des témoins dans un modèle de souris SMA où la forme fœtale des AChR ( $\gamma$ -AChR) est retrouvée à des stades de développement tardifs (Kariya et al. 2008). Plus récemment, une diminution de la surface des AChR, du nombre de perforations, et une expression accrue des sous-unités fœtales  $\gamma$ -AChR ont été décrits dans des modèles humains dérivés de patientes SMA de type I (Harding et al. 2015; Yoshida et al. 2015). Pour des raisons que l'on ignore aujourd'hui, ces signes pathologiques ne sont pas retrouvés dans les conditions de motoneurones craniaux dérivés de hiPSC SMA. Ainsi, des analyses plus approfondies, pour mieux clarifier les défauts moléculaires, fonctionnels et temporels, affectant spécifiquement les motoneurones spinaux SMA, permettront d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour la SMA.

- La vulnérabilité des motoneurones dans la SMA peut-elle être seulement expliquée par une diminution d'expression de SMN ?

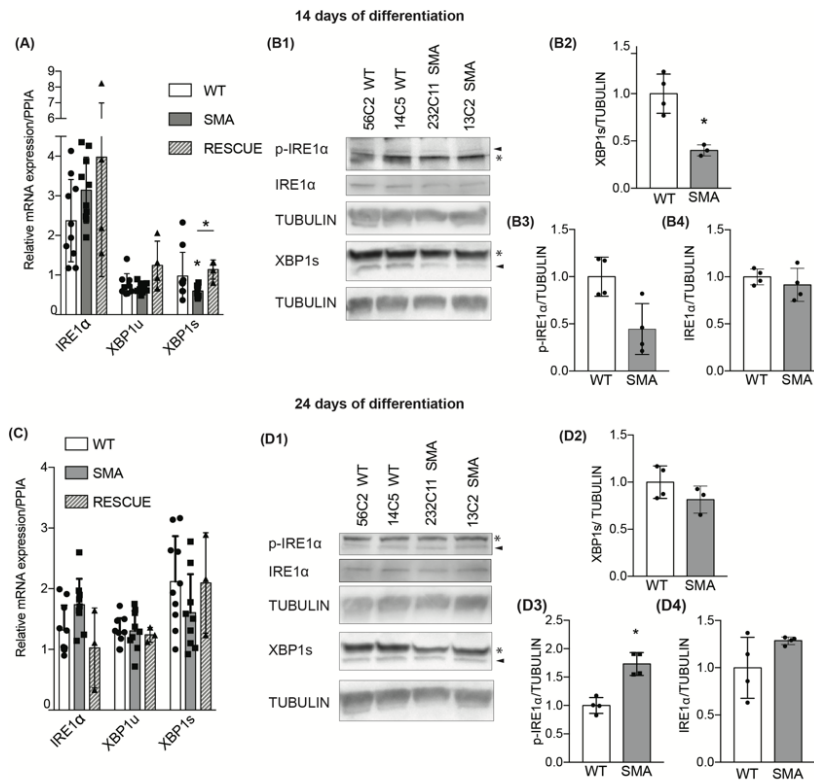
Bien qu'exprimée de manière ubiquitaire, la protéine SMN est retrouvée à des niveaux systématiquement plus élevés dans les tissus du SNC, suggérant un besoin plus élevé de la protéine SMN dans les tissus neuronaux par rapport aux autres tissus (Groen et al. 2018; Sleight et al. 2011). Les mécanismes potentiels sous-jacents à la sensibilité des motoneurones incluent une éventuelle hétérogénéité des niveaux de SMN (Rodriguez-Muela et al. 2017). En effet, en se basant sur des motoneurones dérivés de mESC et de hiPSC SMA, Rodriguez-Muela et ses collègues démontrent qu'au sein des motoneurones, tous n'expriment pas les mêmes niveaux de protéine SMN et suggèrent que ceux exprimant les niveaux les plus faibles sont les plus susceptibles de dégénérer. D'autre part, Ruggiu et ses collègues suggèrent que cette sensibilité serait corrélée avec le défaut d'inclusion de l'exon 7 de *SMN2* qui semble plus important dans les motoneurones de souris SMA par rapport à d'autres cellules de la moelle épinière (Ruggiu et al. 2012). Toutefois, une analyse plus poussée a été réalisée pour déterminer si les différences d'épissage de *SMN2* pouvaient expliquer cette sensibilité

différentielle (Nichterwitz et al. 2020). Pour cela, les niveaux d'expression de l'ARNm de SMN2 pleine longueur ont été évalués dans différents motoneurons vulnérables et résistants obtenus à partir de souris SMN $\Delta$ 7. Les résultats de cette étude démontrent que la vulnérabilité différentielle des sous-types de neurones étudiés ne s'explique pas par des différences d'efficacité d'épissage de l'exon 7. Connaissant la variabilité des niveaux de protéines SMN qui peut être présente entre les tissus dérivés de patients SMA ou les modèles de souris SMA (Groen et al. 2018), ces considérations soulignent la nécessité de confirmer ces derniers résultats dans un modèle humain SMA. Ainsi dans notre étude, la génération des deux principaux sous-types de motoneurons spinaux et craniaux, dérivés des hiPSC de patients SMA et contrôle, nous a permis de démontrer que les motoneurons craniaux SMA, bien qu'exprimant des niveaux similaires en ARNm et protéine SMN que les motoneurons spinaux SMA, ne présentent pas de signe de dégénération. Ces données justifient donc la nécessité d'entreprendre des analyses comparatives plus approfondies pour identifier les mécanismes intrinsèques cellulaires de la vulnérabilité sélective dans la SMA.

- Quels peuvent être les mécanismes moléculaires à l'origine d'une vulnérabilité différentielle des motoneurons dans la SMA ?

Dans le but d'identifier des voies moléculaires pouvant expliquer la dégénérescence des motoneurons dans la SMA, plusieurs études ont réalisé des analyses transcriptomiques sur des motoneurons dérivés d'hiPSC de patients (Ng et al. 2015; Rizzo et al. 2019), ou des moelles épinières entières isolées de souris SMA (Bäumer et al. 2009; Staropoli et al. 2015; Zhang et al. 2013; 2008), en comparaison avec des contrôles sains. Ces analyses transcriptomiques ont permis d'identifier des dérégulations associées à différentes voies de stress cellulaires tels que le stress oxydatif, les dommages à l'ADN, la réponse UPR associée au stress du réticulum endoplasmique (RE) et à l'apoptose (Bäumer et al. 2009; Ng et al. 2015; Rizzo et al. 2019; Staropoli et al. 2015; Zhang et al. 2013; 2008). En effet, Lee Rubin et son équipe ont signalé que les motoneurons SMA exprimaient des niveaux élevés de gènes apoptotiques ainsi que des gènes impliqués dans la voie de stress du RE. Plus particulièrement, leur étude suggère que la réponse UPR (*unfolded protein response*) serait sélectivement activée dans les motoneurons dont le niveau de protéine SMN est insuffisant, entraînant la dégénérescence de ces cellules. Ces résultats sont toutefois assez surprenants car la SMA n'est pas une maladie neurodégénérative caractérisée par la formation d'agrégats dues à des protéines mal conformées. D'autre part, le Dr. Frédéric Charbonnier et son équipe ont précédemment démontré que l'augmentation de l'activité des motoneurons, soit physiologiquement à l'aide d'exercice physique (Biondi et al. 2008) soit pharmacologiquement à l'aide d'agonistes des récepteurs NMDA (Biondi et al. 2010), stimule l'expression de SMN et favorise la survie des motoneurons dans un modèle de souris SMA sévère. De plus, l'analyse transcriptomique de moelle épinière de souris SMA traitées par véhicule ou par NMDA a permis de mettre en évidence l'activation de la réponse UPR après traitement au NMDA (Biondi et al. 2010). Cette divergence apparente les a incités à explorer le statut de la réponse UPR dans différents modèles *in vivo* de souris,

et *in vitro* humain. Dans cette optique, une collaboration s'est formée dans le but d'évaluer la réponse UPR dans notre modèle de motoneurones dérivés d'hiPSC contrôle, SMA et rescue (**Figure 56 - Annexe 1**). La réponse UPR implique l'activation de trois protéines transmembranaires du RE : PERK (*PKR-like ER-associated protein kinase*), ATF6 (*activating transcription factor-6*) et IRE1 (*inositol-requiring enzyme-1*) (Hetz 2012). L'activation de ces trois protéines nécessite leur dissociation de la protéine chaperon BiP/GRP78 qui les maintient dans un état inactif dans les membranes du RE. L'arrivée de protéines dans la lumière du RE entraîne la dissociation de BiP/GRP78 qui va s'associer aux protéines en cours de repliement permettant ainsi l'activation de la voie UPR. Cette étude rapporte que la branche IRE1 $\alpha$ /XBP1s de l'UPR est perturbée dans la SMA, avec une activation de IRE1 $\alpha$  associée à une diminution de l'expression du facteur XBP1s. Cette étude a ainsi permis d'identifier la déplétion en XBP1s comme un facteur contributif dans la pathogenèse de la SMA. La restauration de XBP1s favorise l'expression de SMN *in vitro* et *in vivo* et la survie des motoneurones dans la moelle épinière de souris SMA sévère. Ainsi, les données de cette étude contredisent ceux obtenus par Ng et ses collègues, où ils rapportent que l'ARNm de XBP1s est retrouvé surexprimé dans leur motoneurones SMA (Ng et al. 2015). Cependant, ces données n'ont pas été confirmées dans le modèle de souris SMA qu'ils ont utilisé (Ng et al. 2015), ni dans une étude ultérieure basée sur une analyse transcriptomique de motoneurones dérivés de hiPSC SMA versus contrôle (Rizzo et al. 2019). Ces résultats contradictoires peuvent être expliqués par l'utilisation de protocoles de motoneurones dérivés d'hiPSC différents. En effet les deux autres études se basent, mais de façon différente, sur l'obtention de populations de motoneurones par tri cellulaire, ce qui peut entraîner un certain biais de sélections. Ces différentes études transcriptomiques ont ainsi permis d'identifier des voies pouvant être altérées dans les motoneurones SMA en comparaison avec des motoneurones sains, mais ne permettent pas d'expliquer comment la perte d'une protéine exprimée de manière ubiquitaire peut induire la dégénérescence spécifique dans un sous-type de motoneurones.



**Figure 56 : Les motoneurones dérivés des hiPSC SMA montrent un défaut d'épissage de XBP1.** (A,C) Quantification par RT-qPCR de IRE1α, XBP1u et XBP1s, normalisés sur PPIA dans les MN WT, SMA et RESCUE après 14 (A) ou 24 jours de différenciation (C). (B, D) Quantification par western blot de p-IREα, IRE1α et XBP1s, dans des MN j14 (B) et et j24 (D). Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$ SD, \*  $p < 0,05$ , test T Post Hoc Mann-Whitney Test.

Afin de répondre à cette questions, quelques études se sont récemment intéressées aux changements transcriptionnels entre des populations de neurones SMA présentant des degrés de vulnérabilité différents obtenus à partir de modèle animaux SMA (Murray et al. 2015; Nichterwitz et al. 2020; Boyd et al. 2017). La première de ces études s'est intéressée à comparer le profil transcriptionnel de populations de motoneurones innervant des groupes de muscles distincts : ceux innervant les muscles abdominaux correspondant au motoneurones vulnérables, et ceux innervant les muscles craniaux, correspondant aux motoneurones résistants. En utilisant le modèle de souris  $Smn^{2B/-}$  à un stade pré-symptomatique, cette étude révèle une augmentation sélective et précoce des voies de réponse au stress médiée par P53 dans les motoneurones vulnérables par rapport aux motoneurones résistants (Murray et al. 2015). Cependant, une autre analyse transcriptionnelle, plus récente et basée sur l'utilisation d'un autre modèle murin, le modèle murin  $SMN\Delta7$ , a révélé qu'indépendamment de leur vulnérabilité, tous les motoneurones SMA présentent une activation des voies de signalisation P53 associées aux dommages à l'ADN et à la mort cellulaire (Nichterwitz et al. 2020). De plus, cette étude confirme que le niveau d'expression de  $Smn$  ne semble pas corrélérer avec la vulnérabilité différentielle des différents types de motoneurones étudiés. Ensemble, ces résultats suggèrent que l'activation de la voie P53 pourrait être induite par la perte de SMN dans les motoneurones SMA mais elle n'explique pas la dégénérescence sélective d'un sous-type de

motoneurones. Selon cette étude, les motoneurones oculaires seraient résistants par l'activation de facteurs impliqués dans la survie neuronale, tels que Gdf15, Chl1 et Lif, et la libération de neurotransmetteurs, Syt1, Syt5 et Cplx2. Bien que léger, ils confirment l'effet protecteur du GDF15 après traitement des motoneurones spinaux dérivés de hiPSC.

La génération des deux sous-types de motoneurones craniaux et spinaux dérivés des hiPSC issus de patients SMA et contrôles nous ont permis de réaliser une analyse transcriptomique à différents temps : J14, soit avant la mort sélective des motoneurones spinaux SMA ; et J24 lorsqu'on peut observer la sensibilité différentielle des motoneurones SMA. Les premiers résultats de l'analyse comparative ont révélé un enrichissement de gènes impliqués dans la projection des neurones, la guidance axonale, le transport des vésicules synaptiques mais également les voies de stress cellulaire, tels que l'apoptose. Ces résultats concordent avec des études précédemment effectuées sur différents modèles SMA, y compris la dérégulation de GRIA1 et GRIA2, qui codent des sous-unités centrales des récepteurs du glutamate de type AMPA qui sont essentiels pour les synapses excitatrices glutamatergiques (Rizzo et al. 2019; Zhang et al. 2013). D'autre part, les gènes UNC5, NRXN3 et SEMA6A semblent être intéressants car ils sont tous impliqués dans la neurotransmission et la croissance neuritique (Poliak et al. 2015; Rizzo et al. 2019; Welby et al. 2021). De manière intéressante, nous avons trouvés certains transcrits dérégulés spécifiquement dans la condition motoneurones spinaux SMA qui ont déjà identifié dans d'autres modèles SMA, tels que Neuritin 1 (NRN1), Plastin 3 (PLS3) et Neurocalcin Delta (NCALD) (Akten et al. 2011; Jiang et al. 2019; Oprea et al. 2008; Riessland et al. 2017; Yener et al. 2017). Ces résultats suggèrent que la sensibilité des motoneurones spinaux pourrait être expliquée par la régulation transcriptionnelle de certains gènes importants pour le maintien d'une synapse neuromusculaire fonctionnelle. De plus, l'analyse transcriptomique a permis de mettre en évidence des gènes impliqués dans la survie neuronale tels que des gènes associés au stress oxydatifs (ENC1, PRDX1), et aux voies de signalisation apoptotique (RPH3A, BCL2) et neurotrophique (NTRK1, NTRK3, GFRA2). Nous avons également montré la dérégulation de PRDX1. Fait intéressant, ce gène a récemment été démontré comme un régulateur de la voie de signalisation JNK (Jeziarska-Drutel et al. 2019). D'autre part, bien que la différence soit dans la limite significative, le gène GDF15 initialement identifié dans l'étude de Nichterwitz et al., apparaît différentiellement exprimés entre les motoneurones craniaux et spinaux dans la condition SMA.

Dans le but de poursuivre l'analyse de cette étude transcriptomique, et d'étudier plus en détails la fonction de ces gènes retrouvés dérégulés spécifiquement dans les motoneurones vulnérables SMA, une étudiante en Master 2 arrivée récemment dans l'équipe continue ce travail. L'objectif sera tout d'abord de sélectionner des gènes pertinents, de les valider au niveau ARNm par des analyses de qPCR puis au niveau protéique par Western-Blot. Dans un second temps, le but sera d'étudier la contribution fonctionnelle de ces gènes, ainsi des expériences de perte de fonction dans les motoneurones craniaux SMA pourront être réalisées et analysé dans le modèle de co-culture.

Ces modèles *in vitro* humain pourraient être étendus à l'étude d'autres maladies neuromusculaires telles que la sclérose latérale amyotrophique (SLA). En effet, la SLA aussi présente une sensibilité différentielle des motoneurons (Comley et al. 2016; Nijssen et al. 2017; Nimchinsky et al. 2000). Cette sensibilité différentielle a été attribuée aux propriétés intrinsèques des cellules (Allodi et al. 2016; Brockington et al. 2013; Comley et al. 2015; Hedlund et al. 2010; Kaplan et al. 2014). Il serait ainsi intéressant d'étudier cette sensibilité différentielle dans un modèle humain *in vitro*. De plus, il a été suggéré que plusieurs types de cellules contribuaient à la dégénérescence des motoneurons dans des modèles de souris SLA, y compris, par exemple, les astrocytes (Yamanaka et al. 2008), la microglie (Boillée et al. 2006) et les oligodendrocytes (Kang et al. 2013). Ainsi, la génération de sous-types de motoneurons SLA humain *in vitro* permettrait d'étudier leur rôle dans la vulnérabilité sélective de la SLA en vue d'identifier des voies moléculaires responsables de la résistance des neurones oculomoteurs.

### 3. Identification de nouvelles pistes thérapeutiques pour la SMA

- Quel est l'intérêt d'aller vers du repositionnement pour la SMA ?

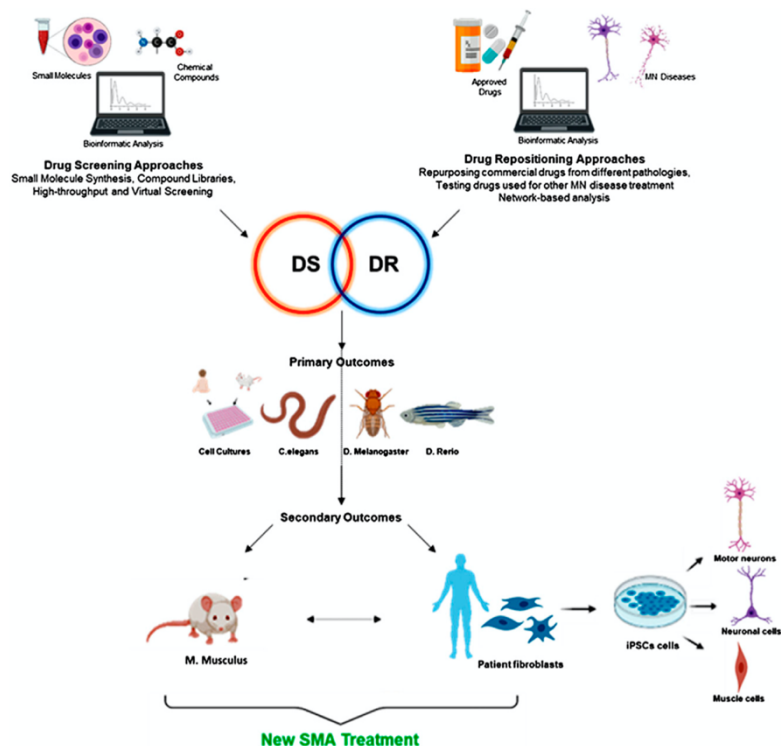
Les prix de certains nouveaux médicaments ont suscité de nombreux débats publics à travers le monde (Kesselheim et al. 2016). Au cœur de ces débats, se trouve l'ampleur des investissements nécessaires en recherche et développement (R&D) par les industries pharmaceutiques pour mettre de nouveaux médicaments sur le marché (Morgan et al. 2011). En 2020, Wouters et ses collègues ont estimé les coûts moyens de R&D pour fournir un nouveau médicament, par domaine thérapeutique, à l'aide de données publiques communiquées par les industries pharmaceutiques (**Tableau 14**) (Wouters et al. 2020). Ils ont ainsi estimé à plus de 1 milliard de dollars USD les coûts de R&D pour délivrer un composé pour une maladie du système nerveux. Avec des coûts de développement aussi élevés, le prix de ces nouvelles thérapies peut atteindre des records, comme par exemple le Zolgensma, le traitement de thérapie génique pour la SMA, qui est vendu à 2,125 millions de dollars l'injection unique.

Therapeutic Area <sup>a</sup>	Sample Size	Expenditure in US\$, Millions (95% CI) <sup>b</sup>	
		Median	Mean
Antineoplastic and immunomodulating agents	20	2771.6 (2051.8-5366.2)	4461.2 (3114.0-6001.3)
Alimentary tract and metabolism	15	1217.6 (613.9-1792.4)	1430.3 (920.8-2078.7)
Nervous system	8	765.9 (323.0-1473.5)	1076.9 (508.7-1847.1)
Antiinfectives for systemic use	5	1259.9 (265.9-2128.3)	1297.2 (672.5-1858.5)
Dermatologicals	4	747.4	1998.3
Cardiovascular system	3	339.4	1152.4
Musculoskeletal system	3	1052.6	937.3
Blood and blood-forming organs	2	793.0	793.0
Sensory organs	2	1302.8	1302.8
Other <sup>c</sup>	1	1121.0	1121.0

**Tableau 14 : Coûts moyens et médians nécessaires pour la recherche et le développement de nouveaux composés thérapeutiques par domaine thérapeutique (Wouters, McKee, and Luyten 2020).**

Dans ce contexte, le repositionnement de médicament permet d'augmenter le spectre d'application d'une molécule, de simplifier les procédures réglementaires pour obtenir une autorisation de mise sur le marché (puisque les études toxicologiques ont déjà été effectués, il n'est pas systématiquement nécessaire d'en refaire), et de réduire le coût de production. Le repositionnement de médicaments englobe trois concepts : (i) les autorisations par extension de gamme où des médicaments approuvés pour une indication sont développés pour des indications supplémentaires ; (ii) le repositionnement de molécules déjà autorisées et commercialisées ou en cours d'essais cliniques pour une autre utilisation ; (iii) le sauvetage de médicaments, pour des molécules ayant déjà suivi un développement clinique mais qui ont été abandonnées (en raison, par exemple, d'un problème d'efficacité ou de toxicité) et sont redirigées vers de nouvelles indications. Pour ces molécules repositionnables, les dossiers d'informations précliniques et cliniques sont déjà existant et permettent une autorisation de mise sur le marché, pour la nouvelle indication, beaucoup plus rapide. De ce fait, cela permet également de réduire drastiquement les coûts de développement de ces médicaments repositionnables. Certains estiment que jusqu'à 75% des médicaments pourraient être repositionnés (Nosengo 2016). Un des premiers exemples de repositionnement est l'aspirine, repositionnée dans les années 1970, en tant qu'antiagrégant plaquettaire pour empêcher la formation de caillots sanguins. Le sildénafil (Viagra) est également fréquemment cité, alors qu'il était en cours de développement pour traiter l'hypertension, il a été repositionné pour le traitement des troubles érectiles par le laboratoire pharmaceutique Pfizer. Un autre antihypertenseur, le minoxidil, développé par Upjohn Company (Pfizer), a été repositionné avec succès pour traiter la chute des cheveux. Soulignons ici que la démarche de repositionnement d'un médicament n'est pas forcément réalisée par le laboratoire qui a initialement commercialisé la molécule. Toutefois, l'un des inconvénients est que les médicaments repositionnés ont une protection intellectuelle moins intéressante. En effet, les molécules commercialisées ont déjà fait l'objet d'un brevet d'invention. Dans le cadre d'un repositionnement, elles ne peuvent plus faire l'objet que d'un brevet d'application dans une nouvelle indication. Or, la protection qui en découle est moins forte que celle conférée par un brevet d'invention. De plus, le gain de temps n'est pas toujours aussi important. Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, une quinzaine d'essais sont encore en phase III. Citons par exemple l'anticancéreux masitinib, le losartan très utilisé comme antihypertenseur, ou encore la metformine un antidiabétique oral. La metformine a également été identifiée par I-STEM comme potentiellement repositionnable pour le traitement de la DM1 (Laustriat et al. 2015), un essai de phase III a été lancé en Italie.





**Figure 57** : Les méthodes de criblage (DS) et de repositionnement de composés (DR) comme approches dans la recherche thérapeutique pour la SMA (Menduti et al. 2020).

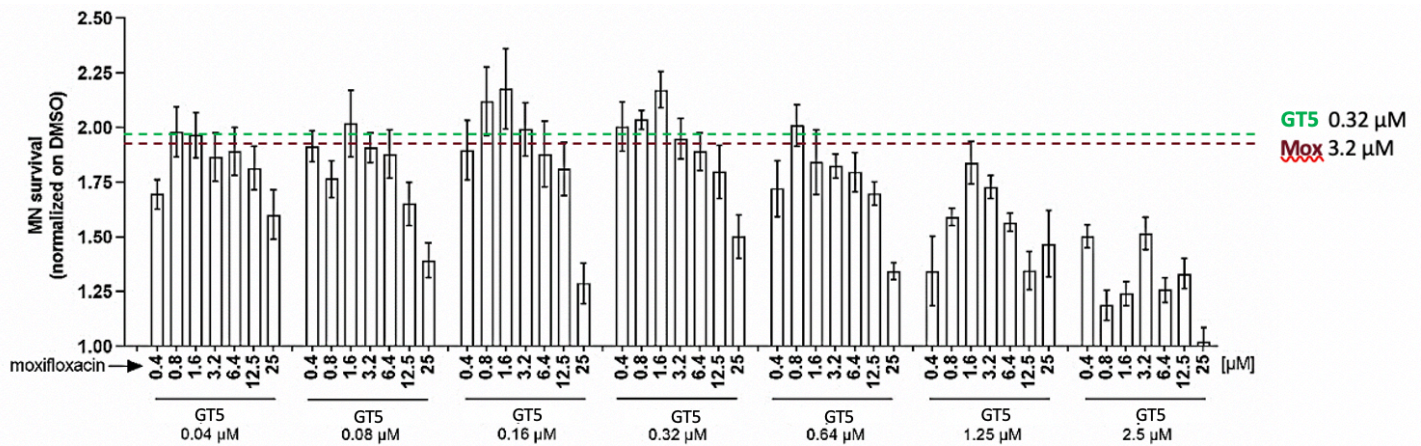
Pour la SMA, il est communément admis que les thérapies actuelles, visant à augmenter les niveaux de protéine SMN, présentent un bénéfice thérapeutique important dans le traitement de la maladie. Néanmoins, ces traitements présentent des limitations importantes telles que : i) le caractère invasif de la voie d'administration (dans le cas de Nusinersen) ; ii) des effets secondaires plus ou moins sévères (Gidaro and Servais 2019) ; iii) leur coût et leur accessibilité commerciale (Hoot 2019; Malone et al. 2019; Rao et al. 2018) ; iv) lorsque le déclin neuromusculaire est déjà établi, il reste difficile de savoir si les traitements induisant l'expression de SMN pourront être efficaces, et ceux pour l'ensemble des patients atteints de SMA. Par conséquent, la nécessité d'identifier de nouvelles pistes thérapeutiques, dépendante ou indépendante de SMN, avec un régime d'administration moins invasif, plus abordable, et ayant la capacité de franchir la barrière hémato-encéphalique, demeure pour la SMA. Dans ce but, deux méthodes sont utilisées pour identifier de nouveaux médicaments : le criblage et le repositionnement de médicaments. (**Figure 57**). Le repositionnement de molécule a déjà permis d'identifier différents médicaments comme potentiellement pertinent pour la SMA (**Tableau 15**). Ces molécules ont été classées sur la base de leur mécanisme d'action, SMN dépendant ou SMN indépendant. Cependant, aucun de ces composés n'a pour l'instant abouti à une autorisation de mise sur le marché.

Molecular mechanism	Compound	Molecular class	Original target disease	Clinical trial phase	Ref. And/or clinical trial
Direct and indirect modulation of <i>SMN2</i> transcription	Sodium butyrate	Organic sodium salt	-	Recruiting-clinical trial for diabetes mellitus, type 1	<a href="#">Chang et al. (2001)</a>
	Sodium phenylbutyrate	Sodium butyrate analogue	Urea cycle disorder	FDA-approved; Completed-clinical trial in SMA	<a href="#">Andreassi et al. (2004)</a> ;
	Valproic acid	Synthetic derivative of propylpentanoic acid	Seizures; status epilepticus; bipolar disorder; migraine; schizophrenia	FDA-approved	<a href="#">Kissel et al. (2011)</a> ;
	Trichostatin A (TSA)	Natural derivative of dihydroxyamino acid	Mycosis	Recruiting-clinical trials for tumors,	<a href="#">Avila et al. (2007)</a>
	Vorinostat (SAHA)	Synthetic hydroxamic acid derivative	Cutaneous T-cell lymphoma	FDA-approved	<a href="#">Hahnen et al. (2006)</a>
	Panobinostat (LH5589)	Cinnamic hydroxamic acid analogue	Multiple myeloma	FDA-approved	<a href="#">Garbes et al. (2009)</a>
	Celecoxib	Cyclo-oxygenase 2 inhibitor	Osteoarthritis, rheumatoid arthritis	FDA-approved; Recruiting-phase II clinical trial for SMA	<a href="#">NCT02876094</a>
	Hydroxyurea (Hydroxycarbamide)	Ribonucleoside diphosphate reductase inhibitor	Chronic myelogenous leukemia;	FDA-approved; Three completed-clinical trial for SMA	<a href="#">Grzeschik et al. (2005)</a> ;
	Aclarubicin	Oligosaccharide anthracycline antineoplastic antibiotic	Acute myeloid leukemia	FDA-approved	<a href="#">Andreassi et al. (2001)</a>
	Moxifloxacin	Synthetic fluoroquinolone antibiotic	CNS infections	FDA-approved	<a href="#">Konieczny and Artero (2020)</a>
	Rigosertib	Synthetic benzyl styryl sulfone analogue	Chronic myelomonocytic leukemia	Currently in phase III clinical trial for chronic myelomonocytic leukemia	<a href="#">Son et al. (2019)</a> ;
Indoprofen (K4277)	Cyclooxygenase (COX) inhibitor	—	Recalled from the market	<a href="#">Kim et al. (2020)</a>	
Cell death and degradation pathways	Levetiracetam	Pyrrolidine	Seizures	FDA-approved	<a href="#">Ando et al. (2019)</a> ;
	Liuwei dihuang extract	Chinese herbal formula	Kidneys, liver and asthma; geriatric diseases	—	<a href="#">Tseng et al. (2017)</a>
	Bortezomib	Dipeptide boronic acid analogue	Multiple myeloma	FDA-approved	<a href="#">Foran et al. (2016)</a>
	Edaravone	Pyrazolone	Amyotrophic lateral sclerosis	FDA-approved	<a href="#">Sun et al. (2019)</a>
L-carnitine	Amino acid derivative	Primary and secondary carnitine deficiency; end-stage renal disease	FDA-approved; Phase II clinical trial for treatment with valproic acid in SMA	<a href="#">Kissel et al. (2011)</a> ;	
Mitochondrial-pathways	Olesoxime	Cholesterol-like structure	Amyotrophic lateral sclerosis	Completed phase III clinical trial for ALS; phase II clinical trial for SMA	<a href="#">Bordet et al. (2007)</a> ;
Cytoskeleton dynamics, endocytic pathway and channel modulators	Fasudil	Heterocyclic aromatic organic compound	Cerebral vasospasm; cerebral ischemic symptoms	PMDA approved in Japan	<a href="#">Bowerman et al. (2012)</a>
	Fampiridine	Aromatic amine	Multiple sclerosis	FDA-approved; Completed-phase III clinical trial in SMA	<a href="#">Sleigh et al. (2011)</a>
	Reldesemtiv (CY 5021)	Small molecule	Chronic obstructive pulmonary disease; amyotrophic lateral sclerosis	Currently in phase II clinical trial for COPD; ALS and SMA	<a href="#">Ramdas and Servais (2020)</a> ;
Hormones signaling pathways	Somatotropin (growth hormone)	Hormone	Chronic renal failure; turner and prader-Willi syndromes; growth disorders	FDA-approved pilot study for SMA	<a href="#">NCT00533221</a> , <a href="#">NCT01369901</a>
	Protirelin	Thyrotropin releasing hormone analogue	Epilepsy; spinal cord injury; spinocerebellar ataxia;	FDA-approved	<a href="#">Tzeng et al. (2000)</a>
	Taltirelin hydrate (TA-0910)	Thyrotropin releasing hormone analogue	Spinocerebellar degeneration disease	Recruiting-phase IV clinical trial for SDD	<a href="#">Ohuchi et al., (2016)</a> ;
Neurotransmitters' modulation	Riluzole	Benzothiazole derivative	Amyotrophic lateral sclerosis	FDA-approved; Completed phase III clinical trial for SMA	<a href="#">Dimitriadis et al. (2013)</a> ;
	Ceftriaxone	Third generation cephalosporin antibiotic	respiratory tract, skin and urinary tract infection	FDA-approved	<a href="#">Nizzardo et al. (2011)</a>
	Lamotrigine	Synthetic phenyltriazine	Lennox–Gastaut syndrome; bipolar disorder and mood episodes	FDA-approved	<a href="#">Nascimento et al. (2010)</a>
Neuromuscular junction stabilization	Gabapentin	GABA chemical analogue	Postherpetic neuralgia; partial-onset seizures; peripheral neuropathic pain; painful diabetic neuropathy	FDA-approved; Clinical trials completed on SMA type II and III patients	<a href="#">Merlini et al. (2003)</a>
	Amifampridine	Organic compound pyridine-derived	Lambert-Eaton myasthenic syndrome (LEMS)	FDA-approved; Recruiting-phase II for SMA	<a href="#">NCT03781479</a> , <a href="#">NCT03819660</a>
	Tideglusib (NP-12, NP031112)	Small heterocyclic thiazolidine-based molecule	Alzheimer's disease; progressive supranuclear palsy; congenital myotonic dystrophy	Completed phase II clinical trial for Alzheimer's disease; Not yet recruiting phase III clinical trial for congenital myotonic dystrophy	<a href="#">Makhortova et al. (2011)</a> ;
Salbutamol (albuterol)	Selective beta2-adrenergic receptor agonist	Asthma, chronic obstructive pulmonary disease	FDA-approved; Recruiting-clinical trial for SMA in French register	<a href="#">Frongia et al. (2019)</a> ;	

**Tableau 15 : Liste des composés repositionnés découverts pour le traitement de la SMA.**  
Adapté de (Menduti et al. 2020).

Évaluer le potentiel de composés repositionnables pour la SMA s'est initialement présenté à nous comme une option. En effet, le Pr. Ruben Artero et son équipe (Université de Valence, Espagne) venait d'identifier des composés repositionnables, dont la moxifloxacine, comme capables d'augmenter l'inclusion de l'exon 7 de *SMN2* dans un modèle de drosophile (Konieczny and Artero 2020). Dans le but de valider ces composés *hits* dans d'autres modèles : *in vitro* humain SMA (fibroblastes, cellules musculaires, motoneurons dérivés d'hiPSC, co-culture de motoneurons et cellules musculaires), et *in vivo* de souris SMA, le Pr. Ruben Artero nous a proposer de montrer une collaboration avec l'équipe du Dr. Marina Boido (Université de Turin, Italie). Ce travail nous a permis de démontrer, d'une part la pertinence de nos modèles pour la validation de composé repositionnable pour la SMA, avec la moxifloxacine en tant que nouvelle famille de médicaments pour traiter cette maladie. D'autre part, ce travail a également abouti au dépôt d'un brevet pour le composé GT5 (EP-08658). Dans l'optique de pouvoir optimiser l'effet tout en diminuant la dose, nous avons également évaluer le potentiel

effet combinatoire de ces composés. Effet combinatoire que nous avons pu observer entre la moxifloxacine et le composé GT5 (**Figure 58**). Le Pr. Ruben Artero et son équipe ont maintenant pour ambition de poursuivre avec le composé GT5 en développement clinique.



**Figure 58 : Effet du composé GT5 en combinaison avec la moxifloxacine sur la survie des motoneurones SMA.** Les cellules ont été traitées en combinatoire avec le GT5 et la moxifloxacine à différentes concentrations et la survie des motoneurones a été mesurée après 10 jours de traitement. Les traits en pointillés vert (GT5) et rouge (Moxifloxacine) représente l'efficacité du traitement respectif seul.

La neurodégénérescence dans la SMA a été largement associée à l'activation de voies de stress intracellulaire et aux processus apoptotiques, sans que les mécanismes moléculaires soient complètement compris (Ando et al. 2017; Gallotta et al. 2016; Ng et al. 2015; Sansa et al. 2021). Genabai et ses collègues ont identifié la voie JNK-cJun comme étant impliquées dans la dégénérescence des motoneurones et l'atrophie musculaire dans le modèle de souris SMA SMNΔ7 (Genabai et al. 2015). Au cours du développement postnatal, les niveaux de JNK phosphorylé sont retrouvés plus de 2 fois supérieure dans la moelle épinière de souris SMA par rapport à la souris contrôle. Parmi les trois isoformes de JNK, JNK3 est celui qui modulerait spécifiquement la neurodégénérescence dans la SMA. En effet, en éliminant génétiquement JNK3 chez des souris SMA, les auteurs ont pu normaliser le phénotype SMA, avec une restauration de la survie des motoneurones de la moelle épinière, et une augmentation de l'innervation des muscles squelettiques (Ahmad et al. 2016; Genabai et al. 2015). D'autres études ont ensuite confirmé ces résultats, en montrant que la voie de signalisation JNK, associée au stress intracellulaire et aux mécanismes apoptotiques, était dérégulée dans la moelle épinière de leur souris SMA (Jiang et al. 2019; Schellino et al. 2018). De plus, ils montrent que l'inhibition pharmacologique de JNK par D-JNKI1 serait protecteur, entraînant une diminution de la neurodégénérescence des motoneurones, de l'inflammation et de l'atrophie musculaire observée dans les souris non traitées. De manière intéressante, nous avons également identifier l'inhibition des voies JNK et GSK3 comme pertinentes pour restaurer les défauts associés à la SMA. Parmi les 12 composés utilisés dans notre étude, nous avons identifié le Tideglusib, un

inhibiteur de GSK-3 $\beta$ , initialement destiné au traitement de la maladie d'Alzheimer et aujourd'hui en essai clinique de phase II pour la DM1 (Horrigan et al. 2020) et la SLA (Martínez-González et al. 2021), qui semble prometteur pour le traitement de la SMA. Afin de confirmer ces résultats, il serait pertinent de tester l'effet du Tideglusib sur des modèles *in vivo* SMA.

Alors que différents criblages de composés pour la SMA ont déjà été effectués, nous pouvons nous demander pourquoi ces composés n'ont pas déjà été identifiés. Cela soulève la question de la pertinence des modèles cellulaires utilisés pour l'étude de la SMA. En effet, depuis la publication initiale décrivant la génération de motoneurone à partir d'hiPSC SMA (Ebert et al. 2009), peu de rapports ont démontré que cette approche pouvait être utilisée à des fins d'identification de composé pour la SMA (Ando et al. 2017; Corti et al. 2012; Liu et al. 2015; Murdocca et al. 2016). Nous avons ainsi pu démontrer à travers ce travail de thèse le développement de nouveaux modèles *in vitro* humain adapté à l'identification et la validation de composés à visée thérapeutique pour la SMA. Le modèle de co-culture, adapté théoriquement au criblage de composé à haut-début par son format en plaque 384 puits, présente toutefois certaines limites. En effet, différents développements ont été réalisés pour l'automatisation de certaines quantifications. Sachant que chaque puits contient environ 50 micropatterns cela peut représenter une importante quantité de données à traiter lors d'un projet de plus grande envergure, type criblage, si toutes les quantifications ne sont pas automatisables. Par exemple, les analyses d'activité calcique sont réalisées en acquisition semi-automatique mais le traitement des vidéos time lapse est réalisé manuellement par la segmentation de chaque micropatterns. Pour pallier cette limitation, le développement d'un modèle optogénétique a été initié dans l'équipe, modèle qu'il serait intéressant d'adapter à notre système de co-culture micropatterné (de Lamotte et al. 2021).

Le modèle neuromusculaire que nous proposons est assimilé à un niveau de maturité développemental, nous ne pouvons donc pas exclure que les phénotypes retrouvés ici sont exacerbés et ne sont donc pas transposables à l'ensemble des patients atteints par la SMA. D'autant plus que nous avons seulement utilisé des hiPSC issus de patients SMA de type I. De plus, nous sommes dans un modèle relativement simple qui ne prend pas en compte toutes les régulations extrinsèques d'un organisme entier, ou du moins du microenvironnement proche. Il est envisageable que des phénomènes compensatoires puissent exister à l'échelle de la NMJ au cours de la maturation et puissent ainsi atténuer ces phénotypes chez le patient. Le développement de modèles complémentaires plus complexe, comme des organoïdes et l'utilisation de hiPSC issus de patients SMA de type II, III et IV, permettrait de mieux appréhender ces limitations.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

---

Au cours de ce travail de thèse, j'ai pu participer au développement de modèles *in vitro* humain, permettant d'étudier les mécanismes impliqués dans la vulnérabilité sélective des motoneurones spinaux dans la SMA d'une part, et étudier les conséquences fonctionnelles de ces défauts en termes de communication avec la cible musculaire d'autre part. Cela m'a permis de mettre en évidence des défauts affectant les motoneurones spinaux et plus particulièrement leur fonction dans la neuroprotection et le maintien de la jonction neuromusculaire dans la SMA. Ces analyses n'étant encore que descriptive, nous pourrions aller étudier la contribution fonctionnelle de ces gènes. Pour cela des expériences de perte de fonction dans les motoneurones craniaux SMA, utilisant la technique CRISPR/Cas9, pourrait être développées. L'objectif serait ensuite d'évaluer différents paramètres en co-culture tels que les clusters de AChR et l'activité calcique au niveau de la cellule musculaire.

On a pu voir apparaître depuis ces dernières années la génération de nombreux modèles *NMJ-like* présentant chacun leurs avantages et inconvénients sans pour autant atteindre une optimisation suffisante pour l'identification de nouveaux composés thérapeutiques. Comme nous avons pu le voir tout au long de ce manuscrit, le challenge est désormais de produire des systèmes plus sophistiqués pour atteindre un niveau de maturité comparable à la NMJ humaine tout en restant suffisamment accessible pour du criblage à visée thérapeutique. Aujourd'hui, aucun système ne répond à tous ces objectifs. Notre modèle est quant à lui disponible en format miniaturiser, il serait donc pertinent de continuer son développement dans le but de le rendre entièrement dérivés d'hiPSC et adapté à du criblage à haut débit pour différentes maladies neuromusculaire, comme la SMA, l'ALS ou la DM1. Nous pourrions également imaginer poursuivre ce travail en réalisant sur ce modèle neuromusculaire une analyse transcriptomique sur cellules uniques (Single cell RNA-seq) dans le but d'étudier plus précisément l'implication de la composante motoneuronale et musculaire dans la SMA.

Grâce à l'utilisation conjointe de plusieurs outils cellulaires et technologiques, ce travail a permis de proposer pour la première fois un modèle humain en format moyen-débit pour l'étude de la sensibilité différentielle des motoneurones dans la SMA. Sur la base de ces résultats, nous pouvons envisager d'élaborer de nouveaux projets de recherches. D'autre part, dans cette étude nous avons démontré le potentiel de ces modèles *in vitro* humain à des fins d'identification et de validation de potentiels composés thérapeutique pour la SMA. Nous avons également pu démontrer le potentiel repositionnable de certains composés pour la SMA. C'est dans ce contexte et grâce à une collaboration avec le Pr. Ruben Artero et le Dr. Marina Boido que nous avons pu valider le potentiel du composé GT5, dans nos modèles *in vitro* humain mais également dans le modèle de souris SMN $\Delta$ 7 et ainsi déposer un brevet. Le Pr. Ruben Artero et son équipe ont pour projet aujourd'hui de poursuivre le développement clinique de ce composé.

D'un point de vue plus personnel, grâce à ce projet, j'ai eu la chance de suivre un projet dans son ensemble en partant du développement d'un modèle et sa caractérisation, jusqu'à son utilisation à des fins d'identification et de validation de composés ayant un potentiel thérapeutique. En conclusion, depuis mon stage de M1 en 2016, alors qu'aucun traitement n'était disponible pour la SMA, et aujourd'hui avec la mise sur le marché des trois thérapies, ce travail m'aura permis de voir la vitesse à laquelle le domaine de la SMA a pu évoluer.

\* \* \*

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

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Abati, Elena, Gaia Citterio, Nereo Bresolin, Giacomo P. Comi, and Stefania Corti. 2020. "Glial Cells Involvement in Spinal Muscular Atrophy: Could SMA Be a Neuroinflammatory Disease?" *Neurobiology of Disease* 140 (July): 104870. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104870>.
- Ackermann, Bastian, Sandra Kröber, Laura Torres-Benito, Anke Borgmann, Miriam Peters, Seyyed Mohsen Hosseini Barkooie, Rocio Tejero, et al. 2013. "Plastin 3 Ameliorates Spinal Muscular Atrophy via Delayed Axon Pruning and Improves Neuromuscular Junction Functionality." *Human Molecular Genetics* 22 (7): 1328–47. <https://doi.org/10.1093/hmg/dd5540>.
- Adami, Raffaella, and Daniele Bottai. 2019. "Spinal Muscular Atrophy Modeling and Treatment Advances by Induced Pluripotent Stem Cells Studies." *Stem Cell Reviews and Reports* 15 (6): 795–813. <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09910-6>.
- Afshar Bakooshli, Mohsen, Ethan S Lippmann, Ben Mulcahy, Nisha Iyer, Christine T Nguyen, Kayee Tung, Bryan A Stewart, et al. 2019. "A 3D Culture Model of Innervated Human Skeletal Muscle Enables Studies of the Adult Neuromuscular Junction." *ELife* 8 (May): e44530. <https://doi.org/10.7554/eLife.44530>.
- Ahmad, Saif, Kanchan Bhatia, Annapoorna Kannan, and Laxman Gangwani. 2016. "Molecular Mechanisms of Neurodegeneration in Spinal Muscular Atrophy." *Journal of Experimental Neuroscience* 10 (January): JEN.S33122. <https://doi.org/10.4137/JEN.S33122>.
- Ahmad, Saif, Yi Wang, Gouse M. Shaik, Arthur H. Burghes, and Laxman Gangwani. 2012. "The Zinc Finger Protein ZPR1 Is a Potential Modifier of Spinal Muscular Atrophy." *Human Molecular Genetics* 21 (12): 2745–58. <https://doi.org/10.1093/hmg/dd5102>.
- Akiba, Yosuke, Akiko Mizuta, Yoshito Kakihara, Juri Nakata, Jun Nihara, Isao Saito, Hiroshi Egusa, and Makio Saeki. 2016. "The Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases and GSK-3 $\beta$  Enhance Osteoclastogenesis." *Biochemistry and Biophysics Reports* 5 (March): 253–58. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.12.011>.
- Akten, Bikem, Min Jeong Kye, Le T. Hao, Mary H. Wertz, Sasha Singh, Duyu Nie, Jia Huang, et al. 2011. "Interaction of Survival of Motor Neuron (SMN) and HuD Proteins with MRNA Cpg15 Rescues Motor Neuron Axonal Deficits." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (25): 10337–42. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104928108>.
- Allodi, Ilary, Laura Comley, Susanne Nichterwitz, Monica Nizzardo, Chiara Simone, Julio Aguila Benitez, Ming Cao, Stefania Corti, and Eva Hedlund. 2016. "Differential Neuronal Vulnerability Identifies IGF-2 as a Protective Factor in ALS." *Scientific Reports* 6 (May): 25960. <https://doi.org/10.1038/srep25960>.
- Allodi, Ilary, and Eva Hedlund. 2014. "Directed Midbrain and Spinal Cord Neurogenesis from Pluripotent Stem Cells to Model Development and Disease in a Dish." *Frontiers in Neuroscience* 8 (May). <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00109>.
- Allodi, Ilary, Jik Nijssen, Julio Aguila Benitez, Christoph Schweingruber, Andrea Fuchs, Gillian Bonvicini, Ming Cao, Ole Kiehn, and Eva Hedlund. 2019. "Modeling Motor Neuron Resilience in ALS Using Stem Cells." *Stem Cell Reports* 12 (6): 1329–41. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.04.009>.
- Alrafiah, Aziza, Evangelia Karyka, Ian Coldicott, Kayleigh Iremonger, Katherin E. Lewis, Ke Ning, and Mimoun Azzouz. 2018. "Plastin 3 Promotes Motor Neuron Axonal Growth and Extends Survival in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy." *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development* 9 (June): 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2018.01.007>.
- Alves, Christiano R. R., Ren Zhang, Alec J. Johnstone, Reid Garner, Pann H. Nwe, Jennifer J. Siranosian, and Kathryn J. Swoboda. 2020. "Serum Creatinine Is a Biomarker of Progressive Denervation in Spinal Muscular Atrophy." *Neurology* 94 (9): e921–31. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000008762>.
- Al-Zaidy, Samiah A., and Jerry R. Mendell. 2019. "From Clinical Trials to Clinical Practice: Practical Considerations for Gene Replacement Therapy in SMA Type 1." *Pediatric Neurology* 100 (November): 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2019.06.007>.
- Amara, Abdelbasset, Labiba Adala, Ilhem Ben Charfeddine, Ons Mamaï, Amira Mili, Taheni Ben Lazreg, Dorra H'mida, et al. 2012. "Correlation of SMN2, NAIP, P44, H4F5 and Occludin Genes Copy Number with Spinal Muscular Atrophy Phenotype in Tunisian Patients." *European Journal of Paediatric Neurology* 16 (2): 167–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2011.07.007>.
- An, Disi, Ryosuke Fujiki, Dylan E Iannitelli, John W Smerdon, Shuvadeep Maity, Matthew F Rose, Alon Gelber, et al. 2019. "Stem Cell-Derived Cranial and Spinal Motor Neurons Reveal Proteostatic Differences between ALS Resistant and Sensitive Motor Neurons." *ELife* 8 (June): e44423. <https://doi.org/10.7554/eLife.44423>.
- Andersen, Jimena, Omer Revah, Yuki Miura, Nicholas Thom, Neal D. Amin, Kevin W. Kelley, Mandeep Singh, et al. 2020. "Generation of Functional Human 3D Cortico-Motor Assembloids." *Cell* 183 (7): 1913–1929.e26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.017>.
- Anderton, R. S., L. L. Price, B. J. Turner, B. P. Meloni, C. Mitrpant, F. L. Mastaglia, C. Goh, S. D. Wilton, and S.



- Boulos. 2012. "Co-Regulation of Survival of Motor Neuron and Bcl-XL Expression: Implications for Neuroprotection in Spinal Muscular Atrophy." *Neuroscience* 220 (September): 228–36. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.06.042>.
- Anderton, Ryan S., Bruno P. Meloni, Frank L. Mastaglia, and Sherif Boulos. 2013. "Spinal Muscular Atrophy and the Antiapoptotic Role of Survival of Motor Neuron (SMN) Protein." *Molecular Neurobiology* 47 (2): 821–32. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8399-5>.
- Ando, Shiori, Michinori Funato, Kazuki Ohuchi, Satoshi Inagaki, Arisu Sato, Junko Seki, Chizuru Kawase, et al. 2019. "The Protective Effects of Levetiracetam on a Human iPSCs-Derived Spinal Muscular Atrophy Model." *Neurochemical Research* 44 (7): 1773–79. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02814-4>.
- Ando, Shiori, Michinori Funato, Kazuki Ohuchi, Tsubasa Kameyama, Satoshi Inagaki, Junko Seki, Chizuru Kawase, et al. 2017. "Edaravone Is a Candidate Agent for Spinal Muscular Atrophy: In Vitro Analysis Using a Human Induced Pluripotent Stem Cells-Derived Disease Model." *European Journal of Pharmacology* 814 (November): 161–68. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.08.005>.
- Ando, Shiori, Miruto Tanaka, Naoki Chinen, Shinsuke Nakamura, Masamitsu Shimazawa, and Hideaki Hara. 2020. "SMN Protein Contributes to Skeletal Muscle Cell Maturation Via Caspase-3 and Akt Activation." *In Vivo* 34 (6): 3247–54. <https://doi.org/10.21873/invivo.12161>.
- Aquilina, Beppe, and Ruben J. Cauchi. 2018. "Genetic Screen Identifies a Requirement for SMN in MRNA Localisation within the Drosophila Oocyte." *BMC Research Notes* 11 (1): 378. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3496-1>.
- Araki, S., M. Hayashi, K. Tamagawa, M. Saito, S. Kato, T. Komori, Y. Sakakihara, T. Mizutani, and M. Oda. 2003. "Neuropathological Analysis in Spinal Muscular Atrophy Type II." *Acta Neuropathologica* 106 (5): 441–48. <https://doi.org/10.1007/s00401-003-0743-9>.
- Araujo, Alexandra prufer de Queiroz Campos, Mario Araujo, and Kathryn J. Swoboda. 2009. "Vascular Perfusion Abnormalities in Infants with Spinal Muscular Atrophy." *The Journal of Pediatrics* 155 (2): 292–94. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.01.071>.
- Arnold, Anne-Sophie, Mor Gueye, Séverine Guettier-Sigrist, Isabelle Courdier-Fruh, Gilliane Coupin, Philippe Poindron, and Jean-Pierre Gies. 2004. "Reduced Expression of Nicotinic AChRs in Myotubes from Spinal Muscular Atrophy I Patients." *Laboratory Investigation* 84 (10): 1271–78. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700163>.
- Assou, Said, Nicolas Girault, Mathilde Plinet, Julien Bouckenheimer, Caroline Sansac, Marion Combe, Joffrey Mianné, et al. 2020. "Recurrent Genetic Abnormalities in Human Pluripotent Stem Cells: Definition and Routine Detection in Culture Supernatant by Targeted Droplet Digital PCR." *Stem Cell Reports* 14 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.12.004>.
- Avery-Kiejda, Kelly A., Brianna Morten, Michelle W. Wong-Brown, Andrea Mathe, and Rodney J. Scott. 2014. "The Relative MRNA Expression of P53 Isoforms in Breast Cancer Is Associated with Clinical Features and Outcome." *Carcinogenesis* 35 (3): 586–96. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt411>.
- Avior, Yishai, Ido Sagi, and Nissim Benvenisty. 2016. "Pluripotent Stem Cells in Disease Modelling and Drug Discovery." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17 (3): 170–82. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.27>.
- Baccon, Jennifer, Livio Pellizzoni, Juri Rappsilber, Matthias Mann, and Gideon Dreyfuss. 2002. "Identification and Characterization of Gemin7, a Novel Component of the Survival of Motor Neuron Complex \*." *Journal of Biological Chemistry* 277 (35): 31957–62. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203478200>.
- Baker, Richard W., and Frederick M. Hughson. 2016. "Chaperoning SNARE Assembly and Disassembly." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 17 (8): 465–79. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.65>.
- Barbeau, Susie, Romain Desprat, Bruno Eymard, Cécile Martinat, Jean-Marc Lemaitre, and Claire Legay. 2020. "Generation of a Human Induced Pluripotent Stem Cell Line (iPSC) from Peripheral Blood Mononuclear Cells of a Patient with a Myasthenic Syndrome Due to Mutation in COLQ." *Stem Cell Research* 49 (December): 102106. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.102106>.
- Barbeau, Susie, Julie Tahraoui-Bories, Claire Legay, and Cécile Martinat. 2020. "Building Neuromuscular Junctions in Vitro." *Development (Cambridge, England)* 147 (22): dev193920. <https://doi.org/10.1242/dev.193920>.
- Barik, Arnab, Lei Li, Anupama Sathyamurthy, Wen-Cheng Xiong, and Lin Mei. 2016. "Schwann Cells in Neuromuscular Junction Formation and Maintenance." *The Journal of Neuroscience* 36 (38): 9770–81. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0174-16.2016>.
- Barik, Arnab, Yisheng Lu, Anupama Sathyamurthy, Andrew Bowman, Chengyong Shen, Lei Li, Wen-cheng Xiong, and Lin Mei. 2014. "LRP4 Is Critical for Neuromuscular Junction Maintenance." *Journal of Neuroscience* 34 (42): 13892–905. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1733-14.2014>.

- Barmada, Sami J., Andrea Serio, Arpana Arjun, Bilada Bilican, Aaron Daub, D. Michael Ando, Andrey Tsvetkov, et al. 2014. "Autophagy Induction Enhances TDP43 Turnover and Survival in Neuronal ALS Models." *Nature Chemical Biology* 10 (8): 677–85. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1563>.
- Barman Balfour, Julia A., and Harriet M. Lamb. 2000. "Moxifloxacin: A Review of Its Clinical Potential in the Management of Community-Acquired Respiratory Tract Infections." *Drugs* 59 (1): 115–39. <https://doi.org/10.2165/00003495-200059010-00010>.
- Bäumer, Dirk, Sheena Lee, George Nicholson, Joanna L. Davies, Nicholas J. Parkinson, Lyndsay M. Murray, Thomas H. Gillingwater, Olaf Ansorge, Kay E. Davies, and Kevin Talbot. 2009. "Alternative Splicing Events Are a Late Feature of Pathology in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy." *PLOS Genetics* 5 (12): e1000773. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000773>.
- Bellin, Milena, Maria C. Marchetto, Fred H. Gage, and Christine L. Mummery. 2012. "Induced Pluripotent Stem Cells: The New Patient?" *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (11): 713–26. <https://doi.org/10.1038/nrm3448>.
- Ben M'Barek, Karim, Stéphane Bertin, Elena Brazhnikova, Céline Jaillard, Walter Habeler, Alexandra Plancheron, Claire-Maëlle Fovet, et al. 2020. "Clinical-Grade Production and Safe Delivery of Human ESC Derived RPE Sheets in Primates and Rodents." *Biomaterials* 230 (February): 119603. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119603>.
- Benarroch, Louise, Gisèle Bonne, François Rivier, and Dalil Hamroun. 2019. "The 2020 Version of the Gene Table of Neuromuscular Disorders (Nuclear Genome)." *Neuromuscular Disorders: NMD* 29 (12): 980–1018. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2019.10.010>.
- Benoit-Pilven, Clara, Camille Marchet, Emilie Chautard, Leandro Lima, Marie-Pierre Lambert, Gustavo Sacomoto, Amandine Rey, et al. 2018. "Complementarity of Assembly-First and Mapping-First Approaches for Alternative Splicing Annotation and Differential Analysis from RNAseq Data." *Scientific Reports* 8 (1): 4307. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21770-7>.
- Bento, Guida, Aygul K. Shafigullina, Albert A. Rizvanov, Vilma A. Sardão, Maria Paula Macedo, and Paulo J. Oliveira. 2020. "Urine-Derived Stem Cells: Applications in Regenerative and Predictive Medicine." *Cells* 9 (3): E573. <https://doi.org/10.3390/cells9030573>.
- Ben-Yehudah, Ahmi, Mira Malcov, Tsvia Frumkin, and Dalit Ben-Yosef. 2012. "Mutated Human Embryonic Stem Cells for the Study of Human Genetic Disorders." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 873: 179–207. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-794-1\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-794-1_11).
- Bergin, Ann, Grace Kim, Donald L. Price, Sangram S. Sisodia, Michael K. Lee, and Bruce A. Rabin. 1997. "Identification and Characterization of a Mouse Homologue of the Spinal Muscular Atrophy-Determining Gene, Survival Motor Neuron." *Gene* 204 (1): 47–53. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00510-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00510-6).
- Bernal, S., L. Alías, M. J. Barceló, E. Also-Rallo, R. Martínez-Hernández, J. Gámez, E. Guillén-Navarro, et al. 2010. "The c.859G>C Variant in the SMN2 Gene Is Associated with Types II and III SMA and Originates from a Common Ancestor." *Journal of Medical Genetics* 47 (9): 640–42. <https://doi.org/10.1136/jmg.2010.079004>.
- Bertini, Enrico, Eric Dessaud, Eugenio Mercuri, Francesco Muntoni, Janbernd Kirschner, Carol Reid, Anna Lusakowska, et al. 2017. "Safety and Efficacy of Olesoxime in Patients with Type 2 or Non-Ambulatory Type 3 Spinal Muscular Atrophy: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 2 Trial." *The Lancet. Neurology* 16 (7): 513–22. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30085-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30085-6).
- Bertrand, S., P. Bulet, O. Clermont, C. Huber, C. Fondrat, D. Thierry-Mieg, A. Munnich, and S. Lefebvre. 1999. "The RNA-Binding Properties of SMN: Deletion Analysis of the Zebrafish Orthologue Defines Domains Conserved in Evolution." *Human Molecular Genetics* 8 (5): 775–82. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.5.775>.
- Bevan, Adam K., Kirk R. Hutchinson, Kevin D. Foust, Lyndsey Braun, Vicki L. McGovern, Leah Schmelzer, Jennifer G. Ward, et al. 2010. "Early Heart Failure in the SMNDelta7 Model of Spinal Muscular Atrophy and Correction by Postnatal ScAAV9-SMN Delivery." *Human Molecular Genetics* 19 (20): 3895–3905. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq300>.
- Bhatt, Jaydeep M. 2016. "The Epidemiology of Neuromuscular Diseases." *Neurologic Clinics, Global and Domestic Public Health and Neuroepidemiology*, 34 (4): 999–1021. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2016.06.017>.
- Biondi, Olivier, Julien Branchu, Gabriel Sanchez, Camille Lancelin, Séverine Deforges, Philippe Lopes, Claude Pariset, et al. 2010. "In Vivo NMDA Receptor Activation Accelerates Motor Unit Maturation, Protects Spinal Motor Neurons, and Enhances SMN2 Gene Expression in Severe Spinal Muscular Atrophy Mice." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (34): 11288–99. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1764-10.2010>.

- Biondi, Olivier, Clément Grondard, Sylvie Lécolle, Séverine Deforges, Claude Pariset, Philippe Lopes, Carmen Cifuentes-Diaz, et al. 2008. "Exercise-Induced Activation of NMDA Receptor Promotes Motor Unit Development and Survival in a Type 2 Spinal Muscular Atrophy Model Mouse." *The Journal of Neuroscience* 28 (4): 953–62. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3237-07.2008>.
- Bizarro, Jonathan, Maxime Dodré, Alexandra Huttin, Bruno Charpentier, Florence Schlotter, Christiane Branlant, Céline Verheggen, Séverine Massenet, and Edouard Bertrand. 2015. "NUFIP and the HSP90/R2TP Chaperone Bind the SMN Complex and Facilitate Assembly of U4-Specific Proteins." *Nucleic Acids Research* 43 (18): 8973–89. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv809>.
- Blotnick-Rubin, Edna, and Lili Anglister. 2018. "Fine Localization of Acetylcholinesterase in the Synaptic Cleft of the Vertebrate Neuromuscular Junction." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11: 123. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00123>.
- Bode, Ann M., and Zigang Dong. 2007. "The Functional Contrariety of JNK." *Molecular Carcinogenesis* 46 (8): 591–98. <https://doi.org/10.1002/mc.20348>.
- Boehm, Ines, Abrar Alhindi, Ana S. Leite, Chandra Logie, Alyssa Gibbs, Olivia Murray, Rizwan Farrukh, et al. 2020. "Comparative Anatomy of the Mammalian Neuromuscular Junction." *Journal of Anatomy* 237 (5): 827–36. <https://doi.org/10.1111/joa.13260>.
- Bogdanik, Laurent P., Melissa A. Osborne, Crystal Davis, Whitney P. Martin, Andrew Austin, Frank Rigo, C. Frank Bennett, and Cathleen M. Lutz. 2015. "Systemic, Postsymptomatic Antisense Oligonucleotide Rescues Motor Unit Maturation Delay in a New Mouse Model for Type II/III Spinal Muscular Atrophy." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (43): E5863–5872. <https://doi.org/10.1073/pnas.1509758112>.
- Boido, Marina, Elena De Amicis, Valeria Valsecchi, Marco Trevisan, Ugo Ala, Markus A. Ruegg, Stefan Hettwer, and Alessandro Vercelli. 2018. "Increasing Agrin Function Antagonizes Muscle Atrophy and Motor Impairment in Spinal Muscular Atrophy." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12 (January): 17. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00017>.
- Boido, Marina, and Alessandro Vercelli. 2016. "Neuromuscular Junctions as Key Contributors and Therapeutic Targets in Spinal Muscular Atrophy." *Frontiers in Neuroanatomy* 10. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnana.2016.00006>.
- Boillée, Séverine, Koji Yamanaka, Christian S. Lobsiger, Neal G. Copeland, Nancy A. Jenkins, George Kassiotis, George Kollias, and Don W. Cleveland. 2006. "Onset and Progression in Inherited ALS Determined by Motor Neurons and Microglia." *Science*, June. <https://doi.org/10.1126/science.1123511>.
- Bolliger, Marc F., Andreas Zurlinden, Daniel Lüscher, Lukas Bütikofer, Olga Shakhova, Maura Francolini, Serguei V. Kozlov, et al. 2010. "Specific Proteolytic Cleavage of Agrin Regulates Maturation of the Neuromuscular Junction." *Journal of Cell Science* 123 (22): 3944–55. <https://doi.org/10.1242/jcs.072090>.
- Bombelli, Francesco, Ludovico Lispi, Sandro Costanzi Porrini, Manlio Giacanelli, Chiara Terracciano, Roberto Massa, and Antonio Petrucci. 2016. "Neuromuscular Transmission Abnormalities in Myotonic Dystrophy Type 1: A Neurophysiological Study." *Clinical Neurology and Neurosurgery* 150 (November): 84–88. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2016.08.020>.
- Boon, Kum-Loong, Shu Xiao, Michelle L. McWhorter, Thomas Donn, Emma Wolf-Saxon, Markus T. Bohnsack, Cecilia B. Moens, and Christine E. Beattie. 2009. "Zebrafish Survival Motor Neuron Mutants Exhibit Presynaptic Neuromuscular Junction Defects." *Human Molecular Genetics* 18 (19): 3615–25. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp310>.
- Bordet, Thierry, Patrick Berna, Jean-Louis Abitbol, and Rebecca M. Pruss. 2010. "Olesoxime (TRO19622): A Novel Mitochondrial-Targeted Neuroprotective Compound." *Pharmaceuticals* 3 (2): 345–68. <https://doi.org/10.3390/ph3020345>.
- Borowiak, Malgorzata, René Maehr, Shuibing Chen, Alice E. Chen, Weiping Tang, Julia L. Fox, Stuart L. Schreiber, and Douglas A. Melton. 2009. "Small Molecules Efficiently Direct Endodermal Differentiation of Mouse and Human Embryonic Stem Cells." *Cell Stem Cell* 4 (4): 348–58. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.01.014>.
- Bowerman, Mélissa, Carrie L. Anderson, Ariane Beauvais, Pietro Pilo Boyl, Walter Witke, and Rashmi Kothary. 2009. "SMN, Profilin IIa and Plastin 3: A Link between the Dereglulation of Actin Dynamics and SMA Pathogenesis." *Molecular and Cellular Neurosciences* 42 (1): 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.05.009>.
- Bowerman, Melissa, Catherina G. Becker, Rafael J. Yáñez-Muñoz, Ke Ning, Matthew J. A. Wood, Thomas H. Gilligwater, Kevin Talbot, and The UK SMA Research Consortium. 2017. "Therapeutic Strategies for Spinal Muscular Atrophy: SMN and Beyond." *Disease Models & Mechanisms* 10 (8): 943–54.

- <https://doi.org/10.1242/dmm.030148>.
- Bowerman, Mélissa, Dina Shafey, and Rashmi Kothary. 2007. "Smn Depletion Alters Profilin II Expression and Leads to Upregulation of the RhoA/ROCK Pathway and Defects in Neuronal Integrity." *Journal of Molecular Neuroscience* 32 (2): 120–31. <https://doi.org/10.1007/s12031-007-0024-5>.
- Bowerman, Melissa, Kathryn J. Swoboda, John-Paul Michalski, Gen-Sheng Wang, Courtney Reeks, Ariane Beauvais, Kelley Murphy, et al. 2012. "Glucose Metabolism and Pancreatic Defects in Spinal Muscular Atrophy." *Annals of Neurology* 72 (2): 256–68. <https://doi.org/10.1002/ana.23582>.
- Boyd, Penelope J., Wen-Yo Tu, Hannah K. Shorrocks, Ewout J. N. Groen, Roderick N. Carter, Rachael A. Powis, Sophie R. Thomson, et al. 2017. "Bioenergetic Status Modulates Motor Neuron Vulnerability and Pathogenesis in a Zebrafish Model of Spinal Muscular Atrophy." Edited by Gregory A. Cox. *PLOS Genetics* 13 (4): e1006744. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006744>.
- Boyer, Justin G., Marc-Olivier Deguise, Lyndsay M. Murray, Armin Yazdani, Yves De Repentigny, Céline Boudreau-Larivière, and Rashmi Kothary. 2014. "Myogenic Program Dysregulation Is Contributory to Disease Pathogenesis in Spinal Muscular Atrophy." *Human Molecular Genetics* 23 (16): 4249–59. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu142>.
- Boza-Morán, María G, Rebeca Martínez-Hernández, Sara Bernal, Klaus Wanisch, Eva Also-Rallo, Anita Le Heron, Laura Alías, et al. 2015. "Decay in Survival Motor Neuron and Plastin 3 Levels during Differentiation of iPSC-Derived Human Motor Neurons." *Scientific Reports* 5 (1): 11696. <https://doi.org/10.1038/srep11696>.
- Brandt, S. 1950. "[Werdnig-Hoffmann's infantile progressive muscular atrophy; clinical aspects, pathology, heredity, and relation to Oppenheim's amyotonia congenita and other morbid conditions with laxity of the joints or muscles in children]." *Nordisk Medicin* 44 (37): 1499.
- Braun, S., J.M. Warter, P. Poindron, B. Croizat, and M.C. Lagrange. 1995. "Constitutive Muscular Abnormalities in Culture in Spinal Muscular Atrophy." *The Lancet* 345 (8951): 694–95. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)90869-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)90869-2).
- Braun, S., Croizat, B., Lagrange, M.-C., Poindron, P., Warter, J.-M., 1997. Degeneration of cocultures of spinal muscular atrophy muscle cells and rat spinal cord explants is not due to secreted factors and cannot be prevented by neurotrophins. *Muscle & Nerve* 20, 953–960. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4598\(199708\)20:8<953::AID-MUS4>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4598(199708)20:8<953::AID-MUS4>3.0.CO;2-5)
- Bricceno, Katherine V., Tara Martinez, Evgenia Leikina, Stephanie Duguez, Terence A. Partridge, Leonid V. Chernomordik, Kenneth H. Fischbeck, Charlotte J. Sumner, and Barrington G. Burnett. 2014. "Survival Motor Neuron Protein Deficiency Impairs Myotube Formation by Altering Myogenic Gene Expression and Focal Adhesion Dynamics." *Human Molecular Genetics* 23 (18): 4745–57. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu189>.
- Briese, Michael, Behrooz Esmaili, Sandrine Fraboulet, Emma C. Burt, Stefanos Christodoulou, Paula R. Towers, Kay E. Davies, and David B. Sattelle. 2009. "Deletion of Smn-1, the Caenorhabditis Elegans Ortholog of the Spinal Muscular Atrophy Gene, Results in Locomotor Dysfunction and Reduced Lifespan." *Human Molecular Genetics* 18 (1): 97–104. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn320>.
- Briggs, R., and T. J. King. 1952. "Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 38 (5): 455–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.38.5.455>.
- Bright, Jessica, Sami Hussain, Vu Dang, Sarah Wright, Bonnie Cooper, Tony Byun, Carla Ramos, et al. 2015. "Human Secreted Tau Increases Amyloid-Beta Production." *Neurobiology of Aging* 36 (2): 693–709. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.007>.
- Briscoe, James, and Bennett G Novitsch. 2008. "Regulatory Pathways Linking Progenitor Patterning, Cell Fates and Neurogenesis in the Ventral Neural Tube." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363 (1489): 57–70. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.2012>.
- Brkušanić, Miloš, Ana Kosać, Vladimir Jovanović, Jovan Pešović, Goran Brajušković, Nikola Dimitrijević, Slobodanka Todorović, Stanka Romac, Vedrana Milić Rašić, and Dušanka Savić-Pavićević. 2015. "Joint Effect of the SMN2 and SERF1A Genes on Childhood-Onset Types of Spinal Muscular Atrophy in Serbian Patients." *Journal of Human Genetics* 60 (11): 723–28. <https://doi.org/10.1038/jhg.2015.104>.
- Brockington, Alice, Ke Ning, Paul R. Heath, Elizabeth Wood, Janine Kirby, Nicolò Fusi, Neil Lawrence, Stephen B. Wharton, Paul G. Ince, and Pamela J. Shaw. 2013. "Unravelling the Enigma of Selective Vulnerability in Neurodegeneration: Motor Neurons Resistant to Degeneration in ALS Show Distinct Gene Expression Characteristics and Decreased Susceptibility to Excitotoxicity." *Acta Neuropathologica* 125 (1): 95–109. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1058-5>.
- Brzustowicz, L. M., T. Lehner, L. H. Castilla, G. K. Penchaszadeh, K. C. Wilhelmsen, R. Daniels, K. E. Davies, M.

- Leppert, F. Ziter, and D. Wood. 1990. "Genetic Mapping of Chronic Childhood-Onset Spinal Muscular Atrophy to Chromosome 5q11.2-13.3." *Nature* 344 (6266): 540–41. <https://doi.org/10.1038/344540a0>.
- Burden, Steven J., Maartje G. Huijbers, and Leonor Remedio. 2018. "Fundamental Molecules and Mechanisms for Forming and Maintaining Neuromuscular Synapses." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (2): E490. <https://doi.org/10.3390/ijms19020490>.
- Burden, Steven J., Norihiro Yumoto, and Wei Zhang. 2013. "The Role of MuSK in Synapse Formation and Neuromuscular Disease." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (5): a009167. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009167>.
- Burghes, Arthur H. M., and Christine E. Beattie. 2009. "Spinal Muscular Atrophy: Why Do Low Levels of Survival Motor Neuron Protein Make Motor Neurons Sick?" *Nature Reviews. Neuroscience* 10 (8): 597–609. <https://doi.org/10.1038/nrn2670>.
- Bürglen, L, T Seroz, P Miniou, S Lefebvre, P Burlet, A Munnich, E V Pequignot, J M Egly, and J Melki. 1997. "The Gene Encoding P44, a Subunit of the Transcription Factor TFIIH, Is Involved in Large-Scale Deletions Associated with Werdnig-Hoffmann Disease." *American Journal of Human Genetics* 60 (1): 72–79. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1712562/>.
- Burlet, P, L Bürglen, O Clermont, S Lefebvre, L Viollet, A Munnich, and J Melki. 1996. "Large Scale Deletions of the 5q13 Region Are Specific to Werdnig-Hoffmann Disease." *Journal of Medical Genetics* 33 (4): 281–83. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1050575/>.
- Burlet, P., C. Huber, S. Bertrand, M. A. Ludosky, I. Zwaenepoel, O. Clermont, J. Roume, et al. 1998. "The Distribution of SMN Protein Complex in Human Fetal Tissues and Its Alteration in Spinal Muscular Atrophy." *Human Molecular Genetics* 7 (12): 1927–33. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.12.1927>.
- Bussaglia, E., O. Clermont, E. Tizzano, S. Lefebvre, L. Bürglen, C. Cruaud, J. A. Urtizberea, J. Colomer, A. Munnich, and M. Baiget. 1995. "A Frame-Shift Deletion in the Survival Motor Neuron Gene in Spanish Spinal Muscular Atrophy Patients." *Nature Genetics* 11 (3): 335–37. <https://doi.org/10.1038/ng1195-335>.
- Butchbach, Matthew E. R. 2016. "Copy Number Variations in the Survival Motor Neuron Genes: Implications for Spinal Muscular Atrophy and Other Neurodegenerative Diseases." *Frontiers in Molecular Biosciences* 3: 7. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00007>.
- Cai, Jinglei, Wen Li, Huanxing Su, Dajiang Qin, Jiayin Yang, Fan Zhu, Jianyong Xu, et al. 2010. "Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells from Umbilical Cord Matrix and Amniotic Membrane Mesenchymal Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (15): 11227–34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.086389>.
- Calucho, Maite, Sara Bernal, Laura Alías, Francesca March, Adoración Venceslá, Francisco J. Rodríguez-Álvarez, Elena Aller, et al. 2018. "Correlation between SMA Type and SMN2 Copy Number Revisited: An Analysis of 625 Unrelated Spanish Patients and a Compilation of 2834 Reported Cases." *Neuromuscular Disorders: NMD* 28 (3): 208–15. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2018.01.003>.
- Campbell, Louise, Kara M. D. Hunter, Payam Mohaghegh, Jonathon M. Tinsley, Michael A. Brasch, and Kay E. Davies. 2000. "Direct Interaction of Smn with Dp103, a Putative RNA Helicase: A Role for Smn in Transcription Regulation?" *Human Molecular Genetics* 9 (7): 1093–1100. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.7.1093>.
- Carissimi, Claudia, Jennifer Baccon, Marco Straccia, Pieranna Chiarella, Alessio Maiolica, Alan Sawyer, Juri Rappsilber, and Livio Pellizzoni. 2005. "Unrip Is a Component of SMN Complexes Active in SnRNP Assembly." *FEBS Letters* 579 (11): 2348–54. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.03.034>.
- Carissimi, Claudia, Luciano Saieva, Jennifer Baccon, Pieranna Chiarella, Alessio Maiolica, Alan Sawyer, Juri Rappsilber, and Livio Pellizzoni. 2006. "Gemin8 Is a Novel Component of the Survival Motor Neuron Complex and Functions in Small Nuclear Ribonucleoprotein Assembly \*." *Journal of Biological Chemistry* 281 (12): 8126–34. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512243200>.
- Caron, Leslie, Devaki Kher, Kian Leong Lee, Robert McKernan, Biljana Dumevska, Alejandro Hidalgo, Jia Li, et al. 2016. "A Human Pluripotent Stem Cell Model of Facioscapulohumeral Muscular Dystrophy-Affected Skeletal Muscles." *Stem Cells Translational Medicine* 5 (9): 1145–61. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0224>.
- Carrasco, David, Thierry Lefèvre, Nicolas Moiroux, Cédric Penetier, Fabrice Chandre, and Anna Cohuet. 2019. "Behavioural Adaptations of Mosquito Vectors to Insecticide Control." *Current Opinion in Insect Science* 34: 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.03.005>.
- Cartegni, Luca, and Adrian R. Krainer. 2002. "Disruption of an SF2/ASF-Dependent Exonic Splicing Enhancer in SMN2 Causes Spinal Muscular Atrophy in the Absence of SMN1." *Nature Genetics* 30 (4): 377–84. <https://doi.org/10.1038/ng854>.
- Carter, Todd A., Carsten G. Bönnemann, Ching H. Wang, Silvana Obici, Enrico Parano, Maria De Fatima Bonaldo,

- Barbara M. Ross, et al. 1997. "A Multicopy Transcription-Repair Gene, BTF2p44, Maps to the SMA Region and Demonstrates SMA Associated Deletions." *Human Molecular Genetics* 6 (2): 229–36. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.2.229>.
- Carvalho, Teresa, Fátima Almeida, Alexandre Calapez, Miguel Lafarga, Maria T. Berciano, and Maria Carmo-Fonseca. 1999. "The Spinal Muscular Atrophy Disease Gene Product, Smn." *The Journal of Cell Biology* 147 (4): 715–28. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2156166/>.
- Castelo-Branco, Gonçalo, Nina Rawal, and Ernest Arenas. 2004. "GSK-3beta Inhibition/Beta-Catenin Stabilization in Ventral Midbrain Precursors Increases Differentiation into Dopamine Neurons." *Journal of Cell Science* 117 (Pt 24): 5731–37. <https://doi.org/10.1242/jcs.01505>.
- Castonguay, Annie, Sébastien Lévesque, and Richard Robitaille. 2001. "Glial Cells as Active Partners in Synaptic Functions." In *Progress in Brain Research*, 132:227–40. Glial Cell Function. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(01\)32079-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(01)32079-4).
- Castonguay, Annie, and Richard Robitaille. 2001. "Differential Regulation of Transmitter Release by Presynaptic and Glial Ca<sup>2+</sup> Internal Stores at the Neuromuscular Synapse." *The Journal of Neuroscience* 21 (6): 1911–22. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-06-01911.2001>.
- Cescon, Matilde, Ilaria Gregorio, Nane Eiber, Dorianna Borgia, Aurora Fusto, Patrizia Sabatelli, Michele Scorzeto, et al. 2018. "Collagen VI Is Required for the Structural and Functional Integrity of the Neuromuscular Junction." *Acta Neuropathologica* 136 (3): 483–99. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1860-9>.
- Cetin, Hakan, David Beeson, Angela Vincent, and Richard Webster. 2020. "The Structure, Function, and Physiology of the Fetal and Adult Acetylcholine Receptor in Muscle." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 13. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2020.581097>.
- Chal, Jérôme, and Olivier Pourquié. 2017. "Making Muscle: Skeletal Myogenesis in Vivo and in Vitro." *Development (Cambridge, England)* 144 (12): 2104–22. <https://doi.org/10.1242/dev.151035>.
- Chali, Farah, Céline Desseille, Léo Houdebine, Evelyne Benoit, Thaïs Rouquet, Bruno Bariohay, Philippe Lopes, et al. 2016. "Long-term Exercise-specific Neuroprotection in Spinal Muscular Atrophy-like Mice." *The Journal of Physiology* 594 (7): 1931–52. <https://doi.org/10.1113/JP271361>.
- Chambers, Stuart M., Christopher A. Fasano, Eirini P. Papapetrou, Mark Tomishima, Michel Sadelain, and Lorenz Studer. 2009. "Highly Efficient Neural Conversion of Human ES and IPS Cells by Dual Inhibition of SMAD Signaling." *Nature Biotechnology* 27 (3): 275–80. <https://doi.org/10.1038/nbt.1529>.
- Chan, Yick Bun, Irene Miguel-Aliaga, Chris Franks, Natasha Thomas, Barbara Trülsch, David B. Sattelle, Kay E. Davies, and Marcel van den Heuvel. 2003. "Neuromuscular Defects in a Drosophila Survival Motor Neuron Gene Mutant." *Human Molecular Genetics* 12 (12): 1367–76. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg157>.
- Chang, Chia-Yu, Hsiao-Chien Ting, Ching-Ann Liu, Hong-Lin Su, Tzyy-Wen Chiou, Shinn-Zong Lin, Horng-Jyh Harn, and Tsung-Jung Ho. 2020. "Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Based Neurodegenerative Disease Models for Phenotype Recapitulation and Drug Screening." *Molecules* 25 (8): 2000. <https://doi.org/10.3390/molecules25082000>.
- Chang, Howard Chia-Hao, Douglas N. Dimlich, Takakazu Yokokura, Ashim Mukherjee, Mark W. Kankel, Anindya Sen, Vasanthi Sridhar, et al. 2008. "Modeling Spinal Muscular Atrophy in Drosophila." *PloS One* 3 (9): e3209. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003209>.
- Chang, Tammy, Weiyan Zheng, Walter Tsark, Steven Bates, He Huang, Ren-Jang Lin, and Jiing-Kuan Yee. 2011. "Brief Report: Phenotypic Rescue of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Motoneurons of a Spinal Muscular Atrophy Patient." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 29 (12): 2090–93. <https://doi.org/10.1002/stem.749>.
- Chaouch, Soraya, Vincent Mouly, Aurélie Goyenville, Adeline Vulin, Kamel Mamchaoui, Elisa Negroni, James Di Santo, et al. 2009. "Immortalized Skin Fibroblasts Expressing Conditional MyoD as a Renewable and Reliable Source of Converted Human Muscle Cells to Assess Therapeutic Strategies for Muscular Dystrophies: Validation of an Exon-Skipping Approach to Restore Dystrophin in Duchenne Muscular Dystrophy Cells." *Human Gene Therapy* 20 (7): 784–90. <https://doi.org/10.1089/hum.2008.163>.
- Charroux, Bernard, Livio Pellizzoni, Robert A. Perkinson, Andrej Shevchenko, Matthias Mann, and Gideon Dreyfuss. 1999. "Gemin3." *The Journal of Cell Biology* 147 (6): 1181–94. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2168095/>.
- Charroux, Bernard, Livio Pellizzoni, Robert A. Perkinson, Jeongsik Yong, Andrej Shevchenko, Matthias Mann, and Gideon Dreyfuss. 2000. "Gemin4." *The Journal of Cell Biology* 148 (6): 1177–86. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2174312/>.
- Chaytow, Helena, Kiterie M. E. Faller, Yu-Ting Huang, and Thomas H. Gillingwater. 2021. "Spinal Muscular Atrophy: From Approved Therapies to Future Therapeutic Targets for Personalized Medicine." *Cell*

- Reports. Medicine* 2 (7): 100346. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100346>.
- Chaytow, Helena, Yu-Ting Huang, Thomas H. Gillingwater, and Kiterie M. E. Faller. 2018. "The Role of Survival Motor Neuron Protein (SMN) in Protein Homeostasis." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 75 (21): 3877–94. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2849-1>.
- Chen, Guokai, Daniel R. Gulbranson, Zhonggang Hou, Jennifer M. Bolin, Victor Ruotti, Mitchell D. Probasco, Kimberly Smuga-Otto, et al. 2011. "Chemically Defined Conditions for Human iPSC Derivation and Culture." *Nature Methods* 8 (5): 424–29. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1593>.
- Chen, Guokai, Zhonggang Hou, Daniel R. Gulbranson, and James A. Thomson. 2010. "Actin-Myosin Contractility Is Responsible for the Reduced Viability of Dissociated Human Embryonic Stem Cells." *Cell Stem Cell* 7 (2): 240–48. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.017>.
- Chen, Kevin G., Barbara S. Mallon, Rebecca S. Hamilton, Olga A. Kozhich, Kyeyoon Park, Daniel J. Hoepfner, Pamela G. Robey, and Ronald D. G. McKay. 2012. "Non-Colony Type Monolayer Culture of Human Embryonic Stem Cells." *Stem Cell Research* 9 (3): 237–48. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2012.06.003>.
- Cheng, Aiwu, Jing Wang, Nathaniel Ghena, Qijin Zhao, Isabella Perone, Todd M. King, Richard L. Veech, Myriam Gorospe, Ruiqian Wan, and Mark P. Mattson. 2020. "SIRT3 Haploinsufficiency Aggravates Loss of GABAergic Interneurons and Neuronal Network Hyperexcitability in an Alzheimer's Disease Model." *The Journal of Neuroscience* 40 (3): 694–709. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1446-19.2019>.
- Cheng, Arthur J., Darren T. Hwee, Leo H. Kim, Nickie Durham, Hsiao T. Yang, Aaron C. Hinken, Adam R. Kennedy, et al. 2019. "Fast Skeletal Muscle Troponin Activator CK-2066260 Increases Fatigue Resistance by Reducing the Energetic Cost of Muscle Contraction." *The Journal of Physiology* 597 (17): 4615–25. <https://doi.org/10.1113/JP278235>.
- Chiaradia, Ilaria, and Madeline A. Lancaster. 2020. "Brain Organoids for the Study of Human Neurobiology at the Interface of in Vitro and in Vivo." *Nature Neuroscience* 23 (12): 1496–1508. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00730-3>.
- Chiriboga, Claudia A. 2017. "Nusinersen for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy." *Expert Review of Neurotherapeutics* 17 (10): 955–62. <https://doi.org/10.1080/14737175.2017.1364159>.
- Cho, Sungchan, and Gideon Dreyfuss. 2010. "A Degron Created by SMN2 Exon 7 Skipping Is a Principal Contributor to Spinal Muscular Atrophy Severity." *Genes & Development* 24 (5): 438–42. <https://doi.org/10.1101/gad.1884910>.
- Chong, Li Chuin, Gayatri Gandhi, Jian Ming Lee, Wendy Wai Yeng Yeo, and Sy-Bing Choi. 2021. "Drug Discovery of Spinal Muscular Atrophy (SMA) from the Computational Perspective: A Comprehensive Review." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (16): 8962. <https://doi.org/10.3390/ijms22168962>.
- Chou, C. K., C. W. Mak, C. C. Hou, J. M. Chang, and W. S. Tzeng. 1997. "CT of the Mesenteric Vascular Anatomy." *Abdominal Imaging* 22 (5): 477–82. <https://doi.org/10.1007/s002619900242>.
- Cifuentes-Diaz, C., T. Frugier, F. D. Tiziano, E. Lacène, N. Roblot, V. Joshi, M. H. Moreau, and J. Melki. 2001. "Deletion of Murine SMN Exon 7 Directed to Skeletal Muscle Leads to Severe Muscular Dystrophy." *The Journal of Cell Biology* 152 (5): 1107–14. <https://doi.org/10.1083/jcb.152.5.1107>.
- Cifuentes-Diaz, Carmen, Sophie Nicole, Maria E. Velasco, Christophe Borra-Cebrian, Cristina Panozzo, Tony Frugier, Gaëlle Millet, Natacha Roblot, Vandana Joshi, and Judith Melki. 2002. "Neurofilament Accumulation at the Motor Endplate and Lack of Axonal Sprouting in a Spinal Muscular Atrophy Mouse Model." *Human Molecular Genetics* 11 (12): 1439–47. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.12.1439>.
- Clerc, Pascaline, Scott Lipnick, and Catherine Willett. 2016. "A Look into the Future of ALS Research." *Drug Discovery Today* 21 (6): 939–49. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.02.002>.
- Cobb, Melissa S., Ferril F. Rose, Hansjörg Rindt, Jacqueline J. Glascock, Monir Shababi, Madeline R. Miller, Erkan Y. Osman, et al. 2013. "Development and Characterization of an SMN2-Based Intermediate Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy." *Human Molecular Genetics* 22 (9): 1843–55. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt037>.
- Cohen, Dena E., and Douglas Melton. 2011. "Turning Straw into Gold: Directing Cell Fate for Regenerative Medicine." *Nature Reviews Genetics* 12 (4): 243–52. <https://doi.org/10.1038/nrg2938>.
- Comley, L., I. Allodi, S. Nichterwitz, M. Nizzardo, C. Simone, S. Corti, and E. Hedlund. 2015. "Motor Neurons with Differential Vulnerability to Degeneration Show Distinct Protein Signatures in Health and ALS." *Neuroscience* 291 (April): 216–29. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.02.013>.
- Comley, Laura H., Jik Nijssen, Johanna Frost-Nylen, and Eva Hedlund. 2016. "Cross-Disease Comparison of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Spinal Muscular Atrophy Reveals Conservation of Selective Vulnerability but Differential Neuromuscular Junction Pathology: Selective Vulnerability in ALS and SMA." *Journal of Comparative Neurology* 524 (7): 1424–42. <https://doi.org/10.1002/cne.23917>.
- Coover, Daniel D., Thanh T. Le, Patricia E. McAndrew, John Strasswimmer, Thomas O. Crawford, Jerry R. Mendell,

- Susan E. Coulson, Elliot J. Androphy, Thomas W. Prior, and Arthur H. M. Burghes. 1997. "The Survival Motor Neuron Protein in Spinal Muscular Atrophy." *Human Molecular Genetics* 6 (8): 1205–14. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.8.1205>.
- Corti, S., M. Nizzardo, C. Simone, M. Falcone, M. Nardini, D. Ronchi, C. Donadoni, et al. 2012. "Genetic Correction of Human Induced Pluripotent Stem Cells from Patients with Spinal Muscular Atrophy." *Science Translational Medicine* 4 (165): 165ra162-165ra162. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004108>.
- Courseaux, Anouk, Florence Richard, Josiane Grosgeorge, Christine Ortola, Agnes Viale, Claude Turc-Carel, Bernard Dutrillaux, Patrick Gaudray, and Jean-Louis Nahon. 2003. "Segmental Duplications in Euchromatic Regions of Human Chromosome 5: A Source of Evolutionary Instability and Transcriptional Innovation." *Genome Research* 13 (3): 369–81. <https://doi.org/10.1101/gr.490303>.
- Court, Felipe A., Thomas H. Gillingwater, Shona Melrose, Diane L. Sherman, Kay N. Greenshields, A. Jennifer Morton, John B. Harris, Hugh J. Willison, and Richard R. Ribchester. 2008. "Identity, Developmental Restriction and Reactivity of Extralaminar Cells Capping Mammalian Neuromuscular Junctions." *Journal of Cell Science* 121 (Pt 23): 3901–11. <https://doi.org/10.1242/jcs.031047>.
- Courtney, Natalie L., Alannah J. Mole, Alison K. Thomson, and Lyndsay M. Murray. 2019. "Reduced P53 Levels Ameliorate Neuromuscular Junction Loss without Affecting Motor Neuron Pathology in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy." *Cell Death & Disease* 10 (7): 515. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1727-6>.
- Couteaux, R. 1947. "Contribution a l'étude de La Synapse Myoneurale." *Rev Canad Biol* 6: 563–711. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10008856704/>.
- Couteaux, R. 1963. "The Differentiation of Synaptic Areas." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* 158 (973): 457–80. <https://doi.org/10.1098/rspb.1963.0058>.
- Couteaux, R., and M. Pécot-Dechavassine. 1970. "[Synaptic vesicles and pouches at the level of 'active zones' of the neuromuscular junction]." *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De l'Academie Des Sciences. Serie D: Sciences Naturelles* 271 (25): 2346–49.
- Cowan, Chad A., Jocelyn Atienza, Douglas A. Melton, and Kevin Eggan. 2005. "Nuclear Reprogramming of Somatic Cells After Fusion with Human Embryonic Stem Cells." *Science* 309 (5739): 1369–73. <https://doi.org/10.1126/science.1116447>.
- Crawford, T. O., and C. A. Pardo. 1996. "The Neurobiology of Childhood Spinal Muscular Atrophy." *Neurobiology of Disease* 3 (2): 97–110. <https://doi.org/10.1006/nbdi.1996.0010>.
- d'Errico, P., Boido, M., Piras, A., Valsecchi, V., De Amicis, E., Locatelli, D., Capra, S., Vagni, F., Vercelli, A., Battaglia, G., 2013. Selective Vulnerability of Spinal and Cortical Motor Neuron Subpopulations in delta7 SMA Mice. *PLoS One* 8, e82654. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082654>
- Dachs, Elisabet, Marta Hereu, Lídia Piedrafita, Anna Casanovas, Jordi Calderó, and Josep E. Esquerda. 2011. "Defective Neuromuscular Junction Organization and Postnatal Myogenesis in Mice With Severe Spinal Muscular Atrophy." *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 70 (6): 444–61. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31821cbd8b>.
- Dale, H. H., W. Feldberg, and M. Vogt. 1936. "Release of Acetylcholine at Voluntary Motor Nerve Endings." *The Journal of Physiology* 86 (4): 353–80. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1936.sp003371>.
- Dale, Jeffrey M., Hailian Shen, Devin M. Barry, Virginia B. Garcia, Ferrill F. Rose, Christian L. Lorson, and Michael L. Garcia. 2011. "The Spinal Muscular Atrophy Mouse Model, SMA $\Delta$ 7, Displays Altered Axonal Transport without Global Neurofilament Alterations." *Acta Neuropathologica* 122 (3): 331–41. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0848-5>.
- Darabi, Radbod, Robert W. Arpke, Stefan Irion, John T. Dimos, Marica Grskovic, Michael Kyba, and Rita C. R. Perlingeiro. 2012. "Human ES- and IPS-Derived Myogenic Progenitors Restore DYSTROPHIN and Improve Contractility upon Transplantation in Dystrophic Mice." *Cell Stem Cell* 10 (5): 610–19. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.02.015>.
- Darabi, Radbod, and Rita C. R. Perlingeiro. 2016. "Derivation of Skeletal Myogenic Precursors from Human Pluripotent Stem Cells Using Conditional Expression of PAX7." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1357: 423–39. [https://doi.org/10.1007/7651\\_2014\\_134](https://doi.org/10.1007/7651_2014_134).
- Darras, Basil T., Thomas O. Crawford, Richard S. Finkel, Eugenio Mercuri, Darryl C. De Vivo, Maryam Oskoui, Eduardo F. Tizzano, et al. 2019. "Neurofilament as a Potential Biomarker for Spinal Muscular Atrophy." *Annals of Clinical and Translational Neurology* 6 (5): 932–44. <https://doi.org/10.1002/acn3.779>.
- Darras, Basil T., and Darryl C. De Vivo. 2018. "Precious SMA Natural History Data: A Benchmark to Measure Future Treatment Successes." *Neurology* 91 (8): 337–39. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000006026>.
- Dasen, Jeremy S., Bonnie C. Tice, Susan Brenner-Morton, and Thomas M. Jessell. 2005. "A Hox Regulatory Network Establishes Motor Neuron Pool Identity and Target-Muscle Connectivity." *Cell* 123 (3): 477–91.



- <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.009>.
- De Sanctis, Roberto, Giorgia Coratti, Amy Pasternak, Jacqueline Montes, Marika Pane, Elena S. Mazzone, Sally Dunaway Young, et al. 2016. "Developmental Milestones in Type I Spinal Muscular Atrophy." *Neuromuscular Disorders: NMD* 26 (11): 754–59. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2016.10.002>.
- De Vivo, Darryl C., Enrico Bertini, Kathryn J. Swoboda, Wuh-Liang Hwu, Thomas O. Crawford, Richard S. Finkel, Janbernd Kirschner, et al. 2019. "Nusinersen Initiated in Infants during the Presymptomatic Stage of Spinal Muscular Atrophy: Interim Efficacy and Safety Results from the Phase 2 NURTURE Study." *Neuromuscular Disorders: NMD* 29 (11): 842–56. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2019.09.007>.
- Deguisse, Marc-Olivier, Giovanni Baranello, Chiara Mastella, Ariane Beauvais, Jean Michaud, Alessandro Leone, Ramona De Amicis, et al. 2019. "Abnormal Fatty Acid Metabolism Is a Core Component of Spinal Muscular Atrophy." *Annals of Clinical and Translational Neurology* 6 (8): 1519–32. <https://doi.org/10.1002/acn3.50855>.
- Deguisse, Marc-Olivier, Justin G. Boyer, Emily R. McFall, Armin Yazdani, Yves De Repentigny, and Rashmi Kothary. 2016. "Differential Induction of Muscle Atrophy Pathways in Two Mouse Models of Spinal Muscular Atrophy." *Scientific Reports* 6 (1): 28846. <https://doi.org/10.1038/srep28846>.
- Deguisse, Marc-Olivier, Chantal Pileggi, Ariane Beauvais, Alexandra Tierney, Lucia Chehade, Yves De Repentigny, Jean Michaud, et al. 2020. "A Mouse Model for Spinal Muscular Atrophy Provides Insights into Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Pathogenesis." Preprint. Pathology. <https://doi.org/10.1101/2020.04.29.051938>.
- Deinsberger, Julia, David Reisinger, and Benedikt Weber. 2020. "Global Trends in Clinical Trials Involving Pluripotent Stem Cells: A Systematic Multi-Database Analysis." *NPJ Regenerative Medicine* 5: 15. <https://doi.org/10.1038/s41536-020-00100-4>.
- Del Castillo, J., and B. Katz. 1954. "Quantal Components of the End-Plate Potential." *The Journal of Physiology* 124 (3): 560–73. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1954.sp005129>.
- Demestre, M., M. Orth, K.J. Föhr, K. Achberger, A.C. Ludolph, S. Liebau, and T.M. Boeckers. 2015. "Formation and Characterisation of Neuromuscular Junctions between hiPSC Derived Motoneurons and Myotubes." *Stem Cell Research* 15 (2): 328–36. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2015.07.005>.
- Dent, Erik W., and Frank B. Gertler. 2003. "Cytoskeletal Dynamics and Transport in Growth Cone Motility and Axon Guidance." *Neuron* 40 (2): 209–27. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00633-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00633-0).
- di Penta, A., Mercaldo, V., Florenzano, F., Munck, S., Ciotti, M.T., Zalfa, F., Mercanti, D., Molinari, M., Bagni, C., Achsel, T., 2009. Dendritic LSm1/CBP80-mRNPs mark the early steps of transport commitment and translational control. *J Cell Biol* 184, 423–435. <https://doi.org/10.1083/jcb.200807033>
- DiDonato, C. J., C. L. Lorson, Y. De Repentigny, L. Simard, C. Chartrand, E. J. Androphy, and R. Kothary. 2001. "Regulation of Murine Survival Motor Neuron (Smn) Protein Levels by Modifying Smn Exon 7 Splicing." *Human Molecular Genetics* 10 (23): 2727–36. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.23.2727>.
- Dimitriadi, Maria, Aaron Derdowski, Geetika Kalloo, Melissa S. Maginnis, Patrick O'Hern, Bryn Bliska, Altar Sorkaç, et al. 2016. "Decreased Function of Survival Motor Neuron Protein Impairs Endocytic Pathways." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (30): E4377–4386. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600015113>.
- Dimitriadi, Maria, Min Jeong Kye, Geetika Kalloo, Jill M. Yersak, Mustafa Sahin, and Anne C. Hart. 2013. "The Neuroprotective Drug Riluzole Acts via Small Conductance Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels to Ameliorate Defects in Spinal Muscular Atrophy Models." *The Journal of Neuroscience* 33 (15): 6557–62. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1536-12.2013>.
- Dimitriadi, Maria, James N. Sleigh, Amy Walker, Howard C. Chang, Anindya Sen, Geetika Kalloo, Jevade Harris, et al. 2010. "Conserved Genes Act as Modifiers of Invertebrate SMN Loss of Function Defects." *PLOS Genetics* 6 (10): e1001172. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001172>.
- Doherty, Gary J., and Harvey T. McMahon. 2009. "Mechanisms of Endocytosis." *Annual Review of Biochemistry* 78: 857–902. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540>.
- Dombert, Benjamin, Rajeeve Sivadasan, Christian M. Simon, Sibylle Jablonka, and Michael Sendtner. 2014. "Presynaptic Localization of Smn and HnRNP R in Axon Terminals of Embryonic and Postnatal Mouse Motoneurons." *PLOS ONE* 9 (10): e110846. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110846>.
- Dominguez, Catherine E., David Cunningham, and Dawn S. Chandler. 2017. "SMN Regulation in SMA and in Response to Stress: New Paradigms and Therapeutic Possibilities." *Human Genetics* 136 (9): 1173–91. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1835-2>.
- Dominguez, Elisa, Thibaut Marais, Nicolas Chatauret, Sofia Benkhelifa-Ziyyat, Sandra Duque, Philippe Ravassard, Romain Carcenac, et al. 2011. "Intravenous ScAAV9 Delivery of a Codon-Optimized SMN1 Sequence Rescues SMA Mice." *Human Molecular Genetics* 20 (4): 681–93. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq514>.

- Dong, Xin, Shi-Bo Xu, Xin Chen, Mengdan Tao, Xiao-Yan Tang, Kai-Heng Fang, Min Xu, et al. 2021. "Human Cerebral Organoids Establish Subcortical Projections in the Mouse Brain after Transplantation." *Molecular Psychiatry* 26 (7): 2964–76. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-00910-4>.
- Donlin-Asp, Paul G., Claudia Fallini, Jazmin Campos, Ching-Chieh Chou, Megan E. Merritt, Han C. Phan, Gary J. Bassell, and Wilfried Rossoll. 2017. "The Survival of Motor Neuron Protein Acts as a Molecular Chaperone for MRNP Assembly." *Cell Reports* 18 (7): 1660–73. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.059>.
- Du, Zhong-Wei, Hong Chen, Huisheng Liu, Jianfeng Lu, Kun Qian, CindyTzu-Ling Huang, Xiaofen Zhong, Frank Fan, and Su-Chun Zhang. 2015. "Generation and Expansion of Highly Pure Motor Neuron Progenitors from Human Pluripotent Stem Cells." *Nature Communications* 6 (March): 6626. <https://doi.org/10.1038/ncomms7626>.
- Dupuis, Luc, and Jean-Philippe Loeffler. 2009. "Neuromuscular Junction Destruction during Amyotrophic Lateral Sclerosis: Insights from Transgenic Models." *Current Opinion in Pharmacology* 9 (3): 341–46. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.03.007>.
- Duque, Sandra I., W. David Arnold, Philipp Odermatt, Xiaohui Li, Paul N. Porensky, Leah Schmelzer, Kathrin Meyer, et al. 2015. "A Large Animal Model of Spinal Muscular Atrophy and Correction of Phenotype." *Annals of Neurology* 77 (3): 399–414. <https://doi.org/10.1002/ana.24332>.
- Durens, Madel, Jonathan Nestor, Madeline Williams, Kevin Herold, Robert F. Niescier, Jason W. Lunden, Andre W. Phillips, Yu-Chih Lin, Derek M. Dykxhoorn, and Michael W. Nestor. 2020. "High-Throughput Screening of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Brain Organoids." *Journal of Neuroscience Methods* 335 (April): 108627. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.108627>.
- Duronio, Robert J., Patrick H. O'Farrell, Greenfield Sluder, and Tin Tin Su. 2017. "Sophisticated Lessons from Simple Organisms: Appreciating the Value of Curiosity-Driven Research." *Disease Models & Mechanisms* 10 (12): 1381–89. <https://doi.org/10.1242/dmm.031203>.
- Ebert, Allison D., Junying Yu, Ferrill F. Rose, Virginia B. Mattis, Christian L. Lorson, James A. Thomson, and Clive N. Svendsen. 2009. "Induced Pluripotent Stem Cells from a Spinal Muscular Atrophy Patient." *Nature* 457 (7227): 277–80. <https://doi.org/10.1038/nature07677>.
- Edens, Brittany M., Senda Ajroud-Driss, Long Ma, and Yong-Chao Ma. 2015. "Molecular Mechanisms and Animal Models of Spinal Muscular Atrophy." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, Neuromuscular Diseases: Pathology and Molecular Pathogenesis*, 1852 (4): 685–92. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.07.024>.
- Edom, F., V. Mouly, J. P. Barbet, M. Y. Fisman, and G. S. Butler-Browne. 1994. "Clones of Human Satellite Cells Can Express in Vitro Both Fast and Slow Myosin Heavy Chains." *Developmental Biology* 164 (1): 219–29. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1193>.
- Eggert, Christian, Ashwin Chari, Bernhard Lagerbauer, and Utz Fischer. 2006. "Spinal Muscular Atrophy: The RNP Connection." *Trends in Molecular Medicine* 12 (3): 113–21. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.01.005>.
- Eguchi, Takahiro, Tohru Tezuka, Takayasu Fukudome, Yuji Watanabe, Hiroshi Sagara, and Yuji Yamanashi. 2020. "Overexpression of Dok-7 in Skeletal Muscle Enhances Neuromuscular Transmission with Structural Alterations of Neuromuscular Junctions: Implications in Robustness of Neuromuscular Transmission." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 523 (1): 214–19. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.12.011>.
- Eguchi, Takahiro, Tohru Tezuka, Sadanori Miyoshi, and Yuji Yamanashi. 2016. "Postnatal Knockdown of Dok-7 Gene Expression in Mice Causes Structural Defects in Neuromuscular Synapses and Myasthenic Pathology." *Genes to Cells* 21 (6): 670–76. <https://doi.org/10.1111/gtc.12370>.
- Eiselleova, Livia, Iveta Peterkova, Jakub Neradil, Iva Slaninova, Ales Hampl, and Petr Dvorak. 2008. "Comparative Study of Mouse and Human Feeder Cells for Human Embryonic Stem Cells." *The International Journal of Developmental Biology* 52 (4): 353–63. <https://doi.org/10.1387/ijdb.082590le>.
- El-Khodor, Bassem F., Kim Cirillo, Jose A. Beltran, Richard Mushlin, Margaret L. Winberg, Rachel Charney, Olga Chomicova, Tara Marino, and Sylvie Ramboz. 2012. "Prediction of Death in the SMNΔ7 Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy: Insight into Disease Stage and Progression." *Journal of Neuroscience Methods* 209 (2): 259–68. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2012.06.020>.
- El-Khodor, Bassem F., Nicole Edgar, Angela Chen, Margaret L. Winberg, Cynthia Joyce, Daniela Brunner, Mayte Suárez-Fariñas, and Melvyn P. Heyes. 2008. "Identification of a Battery of Tests for Drug Candidate Evaluation in the SMNΔ7 Neonate Model of Spinal Muscular Atrophy." *Experimental Neurology* 212 (1): 29–43. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.02.025>.
- El-Matary, Wael, Sunanda Kotagiri, Duncan Cameron, and Ian Peart. 2004. "Spinal Muscle Atrophy Type 1

- (Werdnig-Hoffman Disease) with Complex Cardiac Malformation." *European Journal of Pediatrics* 163 (6): 331–32. <https://doi.org/10.1007/s00431-004-1437-6>.
- Eminli, Sarah, Jochen Utikal, Katrin Arnold, Rudolf Jaenisch, and Konrad Hochedlinger. 2008. "Reprogramming of Neural Progenitor Cells into Induced Pluripotent Stem Cells in the Absence of Exogenous Sox2 Expression." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 26 (10): 2467–74. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0317>.
- Engel, Andrew G., Xin-Ming Shen, Duygu Selcen, and Steven M. Sine. 2015. "Congenital Myasthenic Syndromes: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment." *The Lancet. Neurology* 14 (4): 420–34. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70201-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70201-7).
- Ensini, M., T. N. Tsuchida, H. G. Belting, and T. M. Jessell. 1998. "The Control of Rostrocaudal Pattern in the Developing Spinal Cord: Specification of Motor Neuron Subtype Identity Is Initiated by Signals from Paraxial Mesoderm." *Development (Cambridge, England)* 125 (6): 969–82.
- Eshraghi, Aria, Jungyun Kim, Alexandra C. Walls, Hannah E. Ledvina, Cheryl N. Miller, Kathryn M. Ramsey, John C. Whitney, et al. 2016. "Secreted Effectors Encoded within and Outside of the Francisella Pathogenicity Island Promote Intramacrophage Growth." *Cell Host & Microbe* 20 (5): 573–83. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.10.008>.
- Evans, M. J., and M. H. Kaufman. 1981. "Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos." *Nature* 292 (5819): 154–56. <https://doi.org/10.1038/292154a0>.
- Fabian. 2010. "Moxifloxacin Enhances Etoposide-Induced Cytotoxic, Apoptotic and Anti-Topoisomerase II Effects in a Human Colon Carcinoma Cell Line." *International Journal of Oncology* 37 (2). [https://doi.org/10.3892/ijo\\_00000695](https://doi.org/10.3892/ijo_00000695).
- Fallini, Claudia, Paul G. Donlin-Asp, Jeremy P. Rouanet, Gary J. Bassell, and Wilfried Rossoll. 2016. "Deficiency of the Survival of Motor Neuron Protein Impairs mRNA Localization and Local Translation in the Growth Cone of Motor Neurons." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 36 (13): 3811–20. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2396-15.2016>.
- Fallini, Claudia, Jeremy P. Rouanet, Paul G. Donlin-Asp, Peng Guo, Honglai Zhang, Robert H. Singer, Wilfried Rossoll, and Gary J. Bassell. 2014. "Dynamics of Survival of Motor Neuron (SMN) Protein Interaction with the mRNA-Binding Protein IMP1 Facilitates Its Trafficking into Motor Neuron Axons." *Developmental Neurobiology* 74 (3): 319–32. <https://doi.org/10.1002/dneu.22111>.
- Fallini, Claudia, Honglai Zhang, Yuehang Su, Vincenzo Silani, Robert H. Singer, Wilfried Rossoll, and Gary J. Bassell. 2011. "The Survival of Motor Neuron (SMN) Protein Interacts with the mRNA-Binding Protein HuD and Regulates Localization of Poly(A) mRNA in Primary Motor Neuron Axons." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (10): 3914–25. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3631-10.2011>.
- Falsone, S. Fabio, N. Helge Meyer, Evelyne Schrank, Gerd Leitinger, Chi L.L. Pham, Michelle T. Fodero-Tavoletti, Mats Holmberg, et al. 2012. "SERF Protein Is a Direct Modifier of Amyloid Fiber Assembly." *Cell Reports* 2 (2): 358–71. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.06.012>.
- Fang, Ping, Liang Li, Jian Zeng, Wan-Jun Zhou, Wei-Qing Wu, Ze-Yan Zhong, Ti-Zhen Yan, et al. 2015. "Molecular Characterization and Copy Number of SMN1, SMN2 and NAIP in Chinese Patients with Spinal Muscular Atrophy and Unrelated Healthy Controls." *BMC Musculoskeletal Disorders* 16 (1): 11. <https://doi.org/10.1186/s12891-015-0457-x>.
- Farooq, Faraz, Francisco Abadía-Molina, Duncan MacKenzie, Jeremiah Hadwen, Fahad Shamim, Sean O'Reilly, Martin Holcik, and Alex MacKenzie. 2013. "Celecoxib Increases SMN and Survival in a Severe Spinal Muscular Atrophy Mouse Model via P38 Pathway Activation." *Human Molecular Genetics* 22 (17): 3415–24. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt191>.
- Farrar, Michelle A., Susanna B. Park, Steve Vucic, Kate A. Carey, Bradley J. Turner, Thomas H. Gillingwater, Kathryn J. Swoboda, and Matthew C. Kiernan. 2017. "Emerging Therapies and Challenges in Spinal Muscular Atrophy." *Annals of Neurology* 81 (3): 355–68. <https://doi.org/10.1002/ana.24864>.
- Faustino Martins, Jorge-Miguel, Cornelius Fischer, Alessia Urzi, Ramon Vidal, Severine Kunz, Pierre-Louis Ruffault, Loreen Kabuss, et al. 2020. "Self-Organizing 3D Human Trunk Neuromuscular Organoids." *Cell Stem Cell* 26 (2): 172-186.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.12.007>.
- Feldkötter, Markus, Verena Schwarzer, Radu Wirth, Thomas F. Wienker, and Brunhilde Wirth. 2002. "Quantitative Analyses of SMN1 and SMN2 Based on Real-Time LightCycler PCR: Fast and Highly Reliable Carrier Testing and Prediction of Severity of Spinal Muscular Atrophy." *American Journal of Human Genetics* 70 (2): 358–68. <https://doi.org/10.1086/338627>.
- Feng, Yanming, Xiaoyan Ge, Linyan Meng, Jennifer Scull, Jianli Li, Xia Tian, Tao Zhang, et al. 2017. "The next Generation of Population-Based Spinal Muscular Atrophy Carrier Screening: Comprehensive Pan-Ethnic SMN1 Copy-Number and Sequence Variant Analysis by Massively Parallel Sequencing." *Genetics in*

- Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 19 (8): 936–44. <https://doi.org/10.1038/gim.2016.215>.
- Feng, Zhihua, and Chien-Ping Ko. 2008. “The Role of Glial Cells in the Formation and Maintenance of the Neuromuscular Junction.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 1132: 19–28. <https://doi.org/10.1196/annals.1405.016>.
- Feng, Zhihua, Steven Lam, Elena-Marie Sandino Tenn, Arundhati Sengupta Ghosh, Sarah Cantor, Wei Zhang, Pei-Fen Yen, et al. 2021. “Activation of Muscle-Specific Kinase (MuSK) Reduces Neuromuscular Defects in the Delta7 Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy (SMA).” *International Journal of Molecular Sciences* 22 (15): 8015. <https://doi.org/10.3390/ijms22158015>.
- Feng, Zhihua, Karen K. Y. Ling, Xin Zhao, Chunyi Zhou, Gary Karp, Ellen M. Welch, Nikolai Naryshkin, et al. 2016. “Pharmacologically Induced Mouse Model of Adult Spinal Muscular Atrophy to Evaluate Effectiveness of Therapeutics after Disease Onset.” *Human Molecular Genetics* 25 (5): 964–75. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv629>.
- Ferns, Michael J., James T. Campanelli, Werner Hoch, Richard H. Scheller, and Zach Hall. 1993. “The Ability of Agrin to Cluster AChRs Depends on Alternative Splicing and on Cell Surface Proteoglycans.” *Neuron* 11 (3): 491–502. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90153-l](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90153-l).
- Ferri, A., J. Melki, and A. C. Kato. 2004. “Progressive and Selective Degeneration of Motoneurons in a Mouse Model of SMA.” *Neuroreport* 15 (2): 275–80. <https://doi.org/10.1097/00001756-200402090-00013>.
- Fidziańska, Anna, and Janina Rafalowska. 2002. “Motoneuron Death in Normal and Spinal Muscular Atrophy-Affected Human Fetuses.” *Acta Neuropathologica* 104 (4): 363–68. <https://doi.org/10.1007/s00401-002-0566-0>.
- Filareto, Antonio, Fabrizio Rinaldi, Robert W. Arpke, Radbod Darabi, Joseph J. Belanto, Erik A. Toso, Auston Z. Miller, et al. 2015. “Pax3-Induced Expansion Enables the Genetic Correction of Dystrophic Satellite Cells.” *Skeletal Muscle* 5: 36. <https://doi.org/10.1186/s13395-015-0061-7>.
- Finkel, Richard S., Claudia A. Chiriboga, Jiri Vajsar, John W. Day, Jacqueline Montes, Darryl C. De Vivo, Mason Yamashita, et al. 2016. “Treatment of Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy with Nusinersen: A Phase 2, Open-Label, Dose-Escalation Study.” *Lancet (London, England)* 388 (10063): 3017–26. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31408-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31408-8).
- Finkel, Richard S., Eugenio Mercuri, Oscar H. Meyer, Anita K. Simonds, Mary K. Schroth, Robert J. Graham, Janbernd Kirschner, et al. 2018. “Diagnosis and Management of Spinal Muscular Atrophy: Part 2: Pulmonary and Acute Care; Medications, Supplements and Immunizations; Other Organ Systems; and Ethics.” *Neuromuscular Disorders: NMD* 28 (3): 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2017.11.004>.
- Fischbach, Gerald D. 1970. “Synaptic Potentials Recorded in Cell Cultures of Nerve and Muscle.” *Science*, September. <https://doi.org/10.1126/science.169.3952.1331>.
- Fischer, Utz, Qing Liu, and Gideon Dreyfuss. 1997. “The SMN–SIP1 Complex Has an Essential Role in Spliceosomal SnRNP Biogenesis.” *Cell* 90 (6): 1023–29. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80368-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80368-2).
- Fletcher, Emily V., Christian M. Simon, John G. Pagiazitis, Joshua I. Chalif, Aleksandra Vukojicic, Estelle Drobac, Xiaojian Wang, and George Z. Mentis. 2017. “Reduced Sensory Synaptic Excitation Impairs Motor Neuron Function via Kv2.1 in Spinal Muscular Atrophy.” *Nature Neuroscience* 20 (7): 905–16. <https://doi.org/10.1038/nn.4561>.
- Forristal, Catherine E, Kate L Wright, Neil A Hanley, Richard O C Oreffo, and Franchesca D Houghton. 2010. “Hypoxia Inducible Factors Regulate Pluripotency and Proliferation in Human Embryonic Stem Cells Cultured at Reduced Oxygen Tensions.” *Reproduction (Cambridge, England)* 139 (1): 85–97. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0300>.
- Forsyth, Nicholas R., Antonio Musio, Paolo Vezzoni, A. Hamish R. W. Simpson, Brendon S. Noble, and Jim McWhir. 2006. “Physiologic Oxygen Enhances Human Embryonic Stem Cell Clonal Recovery and Reduces Chromosomal Abnormalities.” *Cloning and Stem Cells* 8 (1): 16–23. <https://doi.org/10.1089/clo.2006.8.16>.
- Foust, Kevin D., Xueyong Wang, Vicki L. McGovern, Lyndsey Braun, Adam K. Bevan, Amanda M. Haidet, Thanh T. Le, et al. 2010. “Rescue of the Spinal Muscular Atrophy Phenotype in a Mouse Model by Early Postnatal Delivery of SMN.” *Nature Biotechnology* 28 (3): 271–74. <https://doi.org/10.1038/nbt.1610>.
- Fox, Michael A., Joshua R. Sanes, Dorin-Bogdan Borza, Veraragavan P. Eswarakumar, Reinhard Fässler, Billy G. Hudson, Simon W. M. John, et al. 2007. “Distinct Target-Derived Signals Organize Formation, Maturation, and Maintenance of Motor Nerve Terminals.” *Cell* 129 (1): 179–93. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.035>.
- Fralish, Zachary, Ethan M. Lotz, Taylor Chavez, Alastair Khodabukus, and Nenad Bursac. 2021. “Neuromuscular Development and Disease: Learning From in Vitro and in Vivo Models.” *Frontiers in Cell and*

- Developmental Biology* 9 (October): 764732. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.764732>.
- Frank-Kamenetsky, Maria, Xiaoyan M. Zhang, Steve Bottega, Oivin Guicherit, Hynek Wichterle, Henryk Dudek, David Bumcrot, et al. 2002. "Small-Molecule Modulators of Hedgehog Signaling: Identification and Characterization of Smoothed Agonists and Antagonists." *Journal of Biology* 1 (2): 10. <https://doi.org/10.1186/1475-4924-1-10>.
- Freigang, Maren, Claudia D. Wurster, Tim Hagenacker, Benjamin Stolte, Markus Weiler, Christoph Kamm, Olivia Schreiber-Katz, et al. 2021. "Serum Creatine Kinase and Creatinine in Adult Spinal Muscular Atrophy under Nusinersen Treatment." *Annals of Clinical and Translational Neurology* 8 (5): 1049–63. <https://doi.org/10.1002/acn3.51340>.
- Friesen, Westley John, and Gideon Dreyfuss. 2000. "Specific Sequences of the Sm and Sm-like (Lsm) Proteins Mediate Their Interaction with the Spinal Muscular Atrophy Disease Gene Product (SMN)\*." *Journal of Biological Chemistry* 275 (34): 26370–75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003299200>.
- Frugier, Tony, Francesco D. Tiziano, Carmen Cifuentes-Diaz, Pierre Miniou, Natacha Roblot, Andrée Dierich, Marianne Le Meur, and Judith Melki. 2000. "Nuclear Targeting Defect of SMN Lacking the C-Terminus in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy." *Human Molecular Genetics* 9 (5): 849–58. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.5.849>.
- Fuller, Heidi R., Berhan Mandefro, Sally L. Shirran, Andrew R. Gross, Anjoscha S. Kaus, Catherine H. Botting, Glenn E. Morris, and Dhruv Sareen. 2016. "Spinal Muscular Atrophy Patient iPSC-Derived Motor Neurons Have Reduced Expression of Proteins Important in Neuronal Development." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9 (January). <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00506>.
- Gabanella, Francesca, Christian Barbato, Marco Fiore, Carla Petrella, Marco de Vincentiis, Antonio Greco, Antonio Minni, Nicoletta Corbi, Claudio Passananti, and Maria Grazia Di Certo. 2021. "Fine-Tuning of MTOR mRNA and Nucleolin Complexes by SMN." *Cells* 10 (11): 3015. <https://doi.org/10.3390/cells10113015>.
- Gabanella, Francesca, Claudia Carissimi, Alessandro Usiello, and Livio Pellizzoni. 2005. "The Activity of the Spinal Muscular Atrophy Protein Is Regulated during Development and Cellular Differentiation." *Human Molecular Genetics* 14 (23): 3629–42. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi390>.
- Gabanella, Francesca, Cinzia Pisani, Antonella Borreca, Stefano Farioli-Vecchioli, Maria Teresa Ciotti, Tiziano Ingegnere, Annalisa Onori, et al. 2016. "SMN Affects Membrane Remodelling and Anchoring of the Protein Synthesis Machinery." *Journal of Cell Science* 129 (4): 804–16. <https://doi.org/10.1242/jcs.176750>.
- Gallotta, Ivan, Nadia Mazzearella, Alessandra Donato, Alessandro Esposito, Justin C. Chaplin, Silvana Castro, Giuseppina Zampi, et al. 2016. "Neuron-Specific Knock-down of SMN1 Causes Neuron Degeneration and Death through an Apoptotic Mechanism." *Human Molecular Genetics* 25 (12): 2564–77. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw119>.
- Gangwani, Laxman, Monique Mikrut, Steven Theroux, Manoj Sharma, and Roger J. Davis. 2001. "Spinal Muscular Atrophy Disrupts the Interaction of ZPR1 with the SMN Protein." *Nature Cell Biology* 3 (4): 376–83. <https://doi.org/10.1038/35070059>.
- Gao, Xiaoyang, Yanling Teng, Jintao Luo, Liange Huang, Min Li, Zhuohua Zhang, Yong-Chao Ma, and Long Ma. 2014. "The Survival Motor Neuron Gene Smn-1 Interacts with the U2AF Large Subunit Gene Uaf-1 to Regulate Caenorhabditis Elegans Lifespan and Motor Functions." *RNA Biology* 11 (9): 1148–60. <https://doi.org/10.4161/rna.36100>.
- Garcera, A., N. Bahi, A. Periyakaruppiyah, S. Arumugam, and R. M. Soler. 2013. "Survival Motor Neuron Protein Reduction Deregulates Autophagy in Spinal Cord Motoneurons in Vitro." *Cell Death & Disease* 4 (June): e686. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.209>.
- Garcera, Ana, Stefka Mincheva, Myriam Gou-Fabregas, Víctor Caraballo-Miralles, Jerònia Lladó, Joan X. Comella, and Rosa M. Soler. 2011. "A New Model to Study Spinal Muscular Atrophy: Neurite Degeneration and Cell Death Is Counteracted by BCL-XL Overexpression in Motoneurons." *Neurobiology of Disease* 42 (3): 415–26. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.02.003>.
- Gautam, Medha, Peter G. Noakes, Jacqueline Mudd, Mia Nichol, Gerald C. Chu, Joshua R. Sanes, and John P. Merlie. 1995. "Failure of Postsynaptic Specialization to Develop at Neuromuscular Junctions of Rapsyn-Deficient Mice." *Nature* 377 (6546): 232–36. <https://doi.org/10.1038/377232a0>.
- Gavrilina, Tatiana O., Vicki L. McGovern, Eileen Workman, Thomas O. Crawford, Rocky G. Gogliotti, Christine J. DiDonato, Umrao R. Monani, Glenn E. Morris, and Arthur H.M. Burghes. 2008. "Neuronal SMN Expression Corrects Spinal Muscular Atrophy in Severe SMA Mice While Muscle-Specific SMN Expression Has No Phenotypic Effect." *Human Molecular Genetics* 17 (8): 1063–75. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm379>.
- Genabai, Naresh K., Saif Ahmad, Zhanying Zhang, Xiaoting Jiang, Cynthia A. Gabaldon, and Laxman Gangwani.

2015. "Genetic Inhibition of JNK3 Ameliorates Spinal Muscular Atrophy." *Human Molecular Genetics*, September, ddv401. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv401>.
- Gerecht-Nir, Sharon, Smadar Cohen, and Joseph Itskovitz-Eldor. 2004. "Bioreactor Cultivation Enhances the Efficiency of Human Embryoid Body (HEB) Formation and Differentiation." *Biotechnology and Bioengineering* 86 (5): 493–502. <https://doi.org/10.1002/bit.20045>.
- Giavazzi, Alessio, Veronica Setola, Alessandro Simonati, and Giorgio Battaglia. 2006. "Neuronal-Specific Roles of the Survival Motor Neuron Protein: Evidence From Survival Motor Neuron Expression Patterns in the Developing Human Central Nervous System." *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 65 (3): 267–77. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000205144.54457.a3>.
- Gidaro, Teresa, and Laurent Servais. 2019. "Nusinersen Treatment of Spinal Muscular Atrophy: Current Knowledge and Existing Gaps." *Developmental Medicine & Child Neurology* 61 (1): 19–24. <https://doi.org/10.1111/dmcn.14027>.
- Giesemann, Torsten, Silvia Rathke-Hartlieb, Martin Rothkegel, Jörg W. Bartsch, Sabine Buchmeier, Brigitte M. Jockusch, and Harald Jockusch. 1999. "A Role for Polyproline Motifs in the Spinal Muscular Atrophy Protein SMN: PROFILINS BIND TO AND COLOCALIZE WITH SMN IN NUCLEAR GEMS \*." *Journal of Biological Chemistry* 274 (53): 37908–14. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.53.37908>.
- Gilliam, T. C., L. M. Brzustowicz, L. H. Castilla, T. Lehner, G. K. Penschaszadeh, R. J. Daniels, B. C. Byth, J. Knowles, J. E. Hislop, and Y. Shapira. 1990. "Genetic Homogeneity between Acute and Chronic Forms of Spinal Muscular Atrophy." *Nature* 345 (6278): 823–25. <https://doi.org/10.1038/345823a0>.
- Gladman, Jordan T., Thomas W. Bebee, Chris Edwards, Xueyong Wang, Zarife Sahenk, Mark M. Rich, and Dawn S. Chandler. 2010. "A Humanized Smn Gene Containing the SMN2 Nucleotide Alteration in Exon 7 Mimics SMN2 Splicing and the SMA Disease Phenotype." *Human Molecular Genetics* 19 (21): 4239–52. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq343>.
- Glennay, J. R., N. Geisler, P. Kaulfus, and K. Weber. 1981. "Demonstration of at Least Two Different Actin-Binding Sites in Villin, a Calcium-Regulated Modulator of F-Actin Organization." *The Journal of Biological Chemistry* 256 (15): 8156–61.
- Gogliotti, Rocky G., Katharina A. Quinlan, Courtenay B. Barlow, Christopher R. Heier, C. J. Heckman, and Christine J. Didonato. 2012. "Motor Neuron Rescue in Spinal Muscular Atrophy Mice Demonstrates That Sensory-Motor Defects Are a Consequence, Not a Cause, of Motor Neuron Dysfunction." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 32 (11): 3818–29. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5775-11.2012>.
- Gois Beghini, Daniela, Samuel Iwao Horita, Cynthia Machado Cascabulho, Luiz Anastácio Alves, and Andrea Henriques-Pons. 2020. "Induced Pluripotent Stem Cells: Hope in the Treatment of Diseases, Including Muscular Dystrophies." *International Journal of Molecular Sciences* 21 (15): 5467. <https://doi.org/10.3390/ijms21155467>.
- Gontard, A. von, K. Zerres, M. Backes, C. Laufersweiler-Plass, C. Wendland, P. Melchers, G. Lehmkuhl, and S. Rudnik-Schöneborn. 2002. "Intelligence and Cognitive Function in Children and Adolescents with Spinal Muscular Atrophy." *Neuromuscular Disorders: NMD* 12 (2): 130–36. [https://doi.org/10.1016/s0960-8966\(01\)00274-7](https://doi.org/10.1016/s0960-8966(01)00274-7).
- Goudenege, Sébastien, Carl Lebel, Nicolas B. Huot, Christine Dufour, Isao Fujii, Jean Gekas, Joël Rousseau, and Jacques P. Tremblay. 2012. "Myoblasts Derived From Normal HESCs and Dystrophic HiPSCs Efficiently Fuse With Existing Muscle Fibers Following Transplantation." *Molecular Therapy* 20 (11): 2153–67. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.188>.
- Gray, Kelsey M., Kevin A. Kaifer, David Baillat, Ying Wen, Thomas R. Bonacci, Allison D. Ebert, Amanda C. Raimer, et al. 2018. "Self-Oligomerization Regulates Stability of Survival Motor Neuron Protein Isoforms by Sequestering an SCFS<sup>lmb</sup> Degron." *Molecular Biology of the Cell* 29 (2): 96–110. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-11-0627>.
- Grice, Stuart J., and Ji-Long Liu. 2011. "Survival Motor Neuron Protein Regulates Stem Cell Division, Proliferation, and Differentiation in *Drosophila*." *PLOS Genetics* 7 (4): e1002030. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002030>.
- Groen, Ewout J N, Elena Perenthaler, Natalie L Courtney, Crispin Y Jordan, Hannah K Shorrocks, Dinja van der Hoorn, Yu-Ting Huang, Lyndsay M Murray, Gabriella Viero, and Thomas H Gillingwater. 2018. "Temporal and Tissue-Specific Variability of SMN Protein Levels in Mouse Models of Spinal Muscular Atrophy." *Human Molecular Genetics* 27 (16): 2851–62. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy195>.
- Groen, Ewout J. N., Kevin Talbot, and Thomas H. Gillingwater. 2018. "Advances in Therapy for Spinal Muscular Atrophy: Promises and Challenges." *Nature Reviews Neurology* 14 (4): 214–24. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2018.4>.

- Guadagno, J, X Xu, M Karajikar, A Brown, and S P Cregan. 2013. "Microglia-Derived TNF $\alpha$  Induces Apoptosis in Neural Precursor Cells via Transcriptional Activation of the Bcl-2 Family Member Puma." *Cell Death & Disease* 4 (3): e538–e538. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.59>.
- Gubitz, Amelie K., Wenqin Feng, and Gideon Dreyfuss. 2004. "The SMN Complex." *Experimental Cell Research* 296 (1): 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.03.022>.
- Gubitz, Amelie K., Zissimos Mourelatos, Linda Abel, Juri Rappsilber, Matthias Mann, and Gideon Dreyfuss. 2002. "Gemin5, a Novel WD Repeat Protein Component of the SMN Complex That Binds Sm Proteins." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (7): 5631–36. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109448200>.
- Guettier-Sigrist, Séverine, Gilliane Coupin, Serge Braun, David Rogovitz, Isabelle Courdier, Jean Marie Warter, and Philippe Poindron. 2001. "On the Possible Role of Muscle in the Pathogenesis of Spinal Muscular Atrophy." *Fundamental & Clinical Pharmacology* 15 (1): 31–40. <https://doi.org/10.1046/j.1472-8206.2001.00006.x>.
- Guo, Xiufang, Mercedes Gonzalez, Maria Stancescu, Herman H. Vandenburg, and James J. Hickman. 2011. "Neuromuscular Junction Formation between Human Stem Cell-Derived Motoneurons and Human Skeletal Muscle in a Defined System." *Biomaterials* 32 (36): 9602–11. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.09.014>.
- Gupta, Kushol, Renee Martin, Robert Sharp, Kathryn L. Sarachan, Nisha S. Ninan, and Gregory D. Van Duyne. 2015. "Oligomeric Properties of Survival Motor Neuron-Gemin2 Complexes \*." *Journal of Biological Chemistry* 290 (33): 20185–99. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.667279>.
- Gurdon, J. B. 1962. "Adult Frogs Derived from the Nuclei of Single Somatic Cells." *Developmental Biology* 4 (April): 256–73. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(62\)90043-x](https://doi.org/10.1016/0012-1606(62)90043-x).
- Gurdon, J. B., and V. Uehlinger. 1966. "'Fertile' Intestine Nuclei." *Nature* 210 (5042): 1240–41. <https://doi.org/10.1038/2101240a0>.
- Hahnen, Eric, Randolph Forkert, Christine Marke, Sabine Rudnik-Schöneborn, Jutta Schönling, Klaus Zerres, and Brunhilde Wirth. 1995. "Molecular Analysis of Candidate Genes on Chromosome 5q13 in Autosomal Recessive Spinal Muscular Atrophy: Evidence of Homozygous Deletions of the SMN Gene in Unaffected Individuals." *Human Molecular Genetics* 4 (November): 1927–33. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.10.1927>.
- Hamilton, Gillian, and Thomas H. Gillingwater. 2013. "Spinal Muscular Atrophy: Going beyond the Motor Neuron." *Trends in Molecular Medicine* 19 (1): 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.11.002>.
- Hammond, Suzan M., Rocky G. Gogliotti, Vamshi Rao, Ariane Beauvais, Rashmi Kothary, and Christine J. DiDonato. 2010. "Mouse Survival Motor Neuron Alleles That Mimic SMN2 Splicing and Are Inducible Rescue Embryonic Lethality Early in Development but Not Late." *PLOS ONE* 5 (12): e15887. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015887>.
- Hamuro, Johko, Osamu Higuchi, Kumiko Okada, Makiko Ueno, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, Hayley Spearman, David Beeson, and Yuji Yamanashi. 2008. "Mutations Causing DOK7 Congenital Myasthenia Ablate Functional Motifs in Dok-7 \*." *Journal of Biological Chemistry* 283 (9): 5518–24. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708607200>.
- Han, Ke-Jun, Daniel Foster, Edward W. Harhaj, Monika Dzieciatkowska, Kirk Hansen, and Chang-Wei Liu. 2016. "Monoubiquitination of Survival Motor Neuron Regulates Its Cellular Localization and Cajal Body Integrity." *Human Molecular Genetics* 25 (7): 1392–1405. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw021>.
- Hao, Jing, Fei-Fei Duan, and Yangming Wang. 2017. "MicroRNAs and RNA Binding Protein Regulators of MicroRNAs in the Control of Pluripotency and Reprogramming." *Current Opinion in Genetics & Development*, Cell reprogramming, 46 (October): 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.07.001>.
- Hao, Le T., Arthur HM Burghes, and Christine E. Beattie. 2011. "Generation and Characterization of a Genetic Zebrafish Model of SMA Carrying the Human SMN2gene." *Molecular Neurodegeneration* 6 (1): 24. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-24>.
- Hao, Le T., Phan Q. Duy, James D. Jontes, Marc Wolman, Michael Granato, and Christine E. Beattie. 2013. "Temporal Requirement for SMN in Motoneuron Development." *Human Molecular Genetics* 22 (13): 2612–25. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt110>.
- Harding, Brian N., Shingo Kariya, Umrao R. Monani, Wendy K. Chung, Maryjane Benton, Sabrina W. Yum, Gihan Tennekoon, and Richard S. Finkel. 2015. "Spectrum of Neuropathophysiology in Spinal Muscular Atrophy Type I." *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 74 (1): 15–24. <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000144>.
- Hassan, Heba Amin, Maha Saad Zaki, Mahmoud Yousry Issa, Nagham Maher El-Bagoury, and Mona Lotfi Essawi. 2020. "Genetic Pattern of SMN1, SMN2, and NAIP Genes in Prognosis of SMA Patients." *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 21 (1): 4. <https://doi.org/10.1186/s43042-019-0044-z>.

- Hausmanowa-Petrusewicz, I., W. Askanas, B. Badurska, B. Emeryk, A. Fidziańska, W. Garbalińska, L. Hetnarska, et al. 1968. "Infantile and Juvenile Spinal Muscular Atrophy." *Journal of the Neurological Sciences* 6 (2): 269–87. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(68\)90096-8](https://doi.org/10.1016/0022-510x(68)90096-8).
- Hawrot, James, Sophie Imhof, and Brian J. Wainger. 2020. "Modeling Cell-Autonomous Motor Neuron Phenotypes in ALS Using iPSCs." *Neurobiology of Disease* 134 (February): 104680. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104680>.
- Hayhurst, Monica, Amanda K. Wagner, Massimiliano Cerletti, Amy J. Wagers, and Lee L. Rubin. 2012. "A Cell-Autonomous Defect in Skeletal Muscle Satellite Cells Expressing Low Levels of Survival of Motor Neuron Protein." *Developmental Biology* 368 (2): 323–34. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.05.037>.
- He, Jin, Qi-Jie Zhang, Qi-Fang Lin, Ya-Fang Chen, Xiao-Zhen Lin, Min-Ting Lin, Shen-Xing Murong, Ning Wang, and Wan-Jin Chen. 2013. "Molecular Analysis of SMN1, SMN2, NAIP, GTF2H2, and H4F5 Genes in 157 Chinese Patients with Spinal Muscular Atrophy." *Gene* 518 (2): 325–29. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.109>.
- Heckmann, Bradlee L., Bart Tummers, and Douglas R. Green. 2019. "Crashing the Computer: Apoptosis vs. Necroptosis in Neuroinflammation." *Cell Death & Differentiation* 26 (1): 41–52. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0195-3>.
- Hedlund, Eva, Martin Karlsson, Teresia Osborn, Wesley Ludwig, and Ole Isacson. 2010. "Global Gene Expression Profiling of Somatic Motor Neuron Populations with Different Vulnerability Identify Molecules and Pathways of Degeneration and Protection." *Brain* 133 (8): 2313–30. <https://doi.org/10.1093/brain/awq167>.
- Heesen, Ludwig, Michael Peitz, Laura Torres-Benito, Irmgard Hölker, Kristina Hupperich, Kristina Dobrindt, Johannes Jungverdorben, et al. 2016. "Plastin 3 Is Upregulated in iPSC-Derived Motoneurons from Asymptomatic SMN1-Deleted Individuals." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 73 (10): 2089–2104. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2084-y>.
- Heier, Christopher R., Rosalba Satta, Cathleen Lutz, and Christine J. DiDonato. 2010. "Arrhythmia and Cardiac Defects Are a Feature of Spinal Muscular Atrophy Model Mice." *Human Molecular Genetics* 19 (20): 3906–18. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq330>.
- Hellbach, Nicole, Suzanne Peterson, Daniel Haehnke, Aditi Shankar, Samuel LaBarge, Cullen Pivaroff, Stefanie Saenger, et al. 2018. "Impaired Myogenic Development, Differentiation and Function in HESC-Derived SMA Myoblasts and Myotubes." Edited by Thomas H. Gillingwater. *PLOS ONE* 13 (10): e0205589. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205589>.
- Hendrickson, B. C., C. Donohoe, V. R. Akmaev, E. A. Sugarman, P. Labrousse, L. Boguslavskiy, K. Flynn, et al. 2009. "Differences in SMN1 Allele Frequencies among Ethnic Groups within North America." *Journal of Medical Genetics* 46 (9): 641–44. <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.066969>.
- Henriquez, Juan P., Anna Webb, Matthew Bence, Heidi Bildsoe, Macarena Sahores, Simon M. Hughes, and Patricia C. Salinas. 2008. "Wnt Signaling Promotes AChR Aggregation at the Neuromuscular Synapse in Collaboration with Agrin." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (48): 18812–17. <https://doi.org/10.1073/pnas.0806300105>.
- Henry, Marianne P., J. Ross Hawkins, Jennifer Boyle, and Joanna M. Bridger. 2019. "The Genomic Health of Human Pluripotent Stem Cells: Genomic Instability and the Consequences on Nuclear Organization." *Frontiers in Genetics* 9. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2018.00623>.
- Hensel, Niko, Svetlana Baskal, Lisa Marie Walter, Hella Brinkmann, Manuela Gernert, and Peter Claus. 2017. "ERK and ROCK Functionally Interact in a Signaling Network That Is Compensationally Upregulated in Spinal Muscular Atrophy." *Neurobiology of Disease* 108 (December): 352–61. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.09.005>.
- Hensel, Niko, Sabrina Kubinski, and Peter Claus. 2020. "The Need for SMN-Independent Treatments of Spinal Muscular Atrophy (SMA) to Complement SMN-Enhancing Drugs." *Frontiers in Neurology* 11 (February): 45. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00045>.
- Heredia, Dante J., Cheng-Yuan Feng, Andrea Agarwal, Kyle Nennecker, Grant W. Hennig, and Thomas W. Gould. 2018. "Postnatal Restriction of Activity-Induced Ca<sup>2+</sup> Responses to Schwann Cells at the Neuromuscular Junction Are Caused by the Proximo-Distal Loss of Axonal Synaptic Vesicles during Development." *The Journal of Neuroscience* 38 (40): 8650–65. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0956-18.2018>.
- Hetz, Claudio. 2012. "The Unfolded Protein Response: Controlling Cell Fate Decisions under ER Stress and Beyond." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (2): 89–102. <https://doi.org/10.1038/nrm3270>.
- Heude, Eglantine, Marketa Tesarova, Elizabeth M Sefton, Estelle Jullian, Noritaka Adachi, Alexandre Grimaldi, Tomas Zikmund, et al. 2018. "Unique Morphogenetic Signatures Define Mammalian Neck Muscles and Associated Connective Tissues." Edited by Clare Blackburn, Didier YR Stainier, and Valerie Wilson. *ELife*



- 7 (November): e40179. <https://doi.org/10.7554/eLife.40179>.
- Hoffmann, J. 1893. "Ueber chronische spinale Muskelatrophie im Kindesalter, auf familiärer Basis." *Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde* 3 (6): 427–70. <https://doi.org/10.1007/BF01668496>.
- Hofmann, Yvonne, Christian L. Lorson, Stefan Stamm, Elliot J. Androphy, and Brunhilde Wirth. 2000. "Htra2-B1 Stimulates an Exonic Splicing Enhancer and Can Restore Full-Length SMN Expression to Survival Motor Neuron 2 (SMN2)." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (17): 9618–23. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC16914/>.
- Hoot, Nathan R. 2019. "Nusinersen for Type 1 Spinal Muscular Atrophy: A Father's Perspective." *Pediatrics* 144 (4): e20190226. <https://doi.org/10.1542/peds.2019-0226>.
- Hor, Jin Hui, Eunice Shi-Yi Soh, Li Yi Tan, Valerie Jing Wen Lim, Munirah Mohamad Santosa, Winanto, Beatrice Xuan Ho, Yong Fan, Boon-Seng Soh, and Shi-Yan Ng. 2018. "Cell Cycle Inhibitors Protect Motor Neurons in an Organoid Model of Spinal Muscular Atrophy." *Cell Death & Disease* 9 (11): 1100. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1081-0>.
- Hörner, Sarah Janice, Nathalie Couturier, Roman Bruch, Philipp Koch, Mathias Hafner, and Rüdiger Rudolf. 2021. "HiPSC-Derived Schwann Cells Influence Myogenic Differentiation in Neuromuscular Cocultures." *Cells* 10 (12): 3292. <https://doi.org/10.3390/cells10123292>.
- Horrigan, Joseph, Tiago Bernardino Gomes, Mike Snape, Nikoleta Nikolenko, Alison McMorn, Stuart Evans, Alex Yaroshinsky, Oscar Della Pasqua, Sean Oosterholt, and Hanns Lochmüller. 2020. "A Phase 2 Study of AMO-02 (Tideglusib) in Congenital and Childhood-Onset Myotonic Dystrophy Type 1 (DM1)." *Pediatric Neurology* 112 (November): 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2020.08.001>.
- Hosseinibarkooie, Seyyedmohsen, Miriam Peters, Laura Torres-Benito, Raphael H. Rastetter, Kristina Hupperich, Andrea Hoffmann, Natalia Mendoza-Ferreira, et al. 2016. "The Power of Human Protective Modifiers: PLS3 and CORO1C Unravel Impaired Endocytosis in Spinal Muscular Atrophy and Rescue SMA Phenotype." *American Journal of Human Genetics* 99 (3): 647–65. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.07.014>.
- Hsieh-Li, H. M., J. G. Chang, Y. J. Jong, M. H. Wu, N. M. Wang, C. H. Tsai, and H. Li. 2000. "A Mouse Model for Spinal Muscular Atrophy." *Nature Genetics* 24 (1): 66–70. <https://doi.org/10.1038/71709>.
- Hsu, Shih-Hsien, Ming-Chi Lai, Tze-Kiong Er, San-Nan Yang, Chih-Hsing Hung, Hsin-Hung Tsai, Yu-Chieh Lin, Jan-Gowth Chang, Yi-Ching Lo, and Yuh-Jyh Jong. 2010. "Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase L1 (UCHL1) Regulates the Level of SMN Expression through Ubiquitination in Primary Spinal Muscular Atrophy Fibroblasts." *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 411 (23–24): 1920–28. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.07.035>.
- Hua, Y., K. Sahashi, G. Hung, F. Rigo, M. A. Passini, C. F. Bennett, and A. R. Krainer. 2010. "Antisense Correction of SMN2 Splicing in the CNS Rescues Necrosis in a Type III SMA Mouse Model." *Genes & Development* 24 (15): 1634–44. <https://doi.org/10.1101/gad.1941310>.
- Hua, Yimin, Ying Hsiu Liu, Kentaro Sahashi, Frank Rigo, C. Frank Bennett, and Adrian R. Krainer. 2015. "Motor Neuron Cell-Nonautonomous Rescue of Spinal Muscular Atrophy Phenotypes in Mild and Severe Transgenic Mouse Models." *Genes & Development* 29 (3): 288–97. <https://doi.org/10.1101/gad.256644.114>.
- Hua, Yimin, Kentaro Sahashi, Frank Rigo, Gene Hung, Guy Horev, C. Frank Bennett, and Adrian R. Krainer. 2011. "Peripheral SMN Restoration Is Essential for Long-Term Rescue of a Severe Spinal Muscular Atrophy Mouse Model." *Nature* 478 (7367): 123–26. <https://doi.org/10.1038/nature10485>.
- Hua, Yimin, Timothy A. Vickers, Hazeem L. Okunola, C. Frank Bennett, and Adrian R. Krainer. 2008. "Antisense Masking of an HnRNP A1/A2 Intronic Splicing Silencer Corrects SMN2 Splicing in Transgenic Mice." *The American Journal of Human Genetics* 82 (4): 834–48. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.01.014>.
- Huang, Zhong, Rebecca Powell, James B. Phillips, and Kirsten Haastert-Talini. 2020. "Perspective on Schwann Cells Derived from Induced Pluripotent Stem Cells in Peripheral Nerve Tissue Engineering." *Cells* 9 (11): 2497. <https://doi.org/10.3390/cells9112497>.
- Huh, Dongeun, Geraldine A. Hamilton, and Donald E. Ingber. 2011. "From 3D Cell Culture to Organs-on-Chips." *Trends in Cell Biology* 21 (12): 745–54. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.09.005>.
- Humbert, S., H. van Vuuren, Y. Lutz, J. H. Hoeijmakers, J. M. Egly, and V. Moncollin. 1994. "P44 and P34 Subunits of the BTF2/TFIIH Transcription Factor Have Homologies with SSL1, a Yeast Protein Involved in DNA Repair." *The EMBO Journal* 13 (10): 2393–98.
- Hunter, Gillian, Arwin Aghamaleky Sarvestany, Sarah L. Roche, Rebecca C. Symes, and Thomas H. Gillingwater. 2014. "SMN-Dependent Intrinsic Defects in Schwann Cells in Mouse Models of Spinal Muscular Atrophy." *Human Molecular Genetics* 23 (9): 2235–50. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt612>.
- Husedzinovic, Alma, Felix Oppermann, Stefanie Draeger-Meurer, Ashwin Chari, Utz Fischer, Henrik Daub, and

- Oliver J. Gruss. 2014. "Phosphoregulation of the Human SMN Complex." *European Journal of Cell Biology* 93 (3): 106–17. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2014.01.006>.
- Ilic, Dusko, and Caroline Ogilvie. 2017. "Concise Review: Human Embryonic Stem Cells-What Have We Done? What Are We Doing? Where Are We Going?" *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 35 (1): 17–25. <https://doi.org/10.1002/stem.2450>.
- Imamura, Keiko, Yuishin Izumi, Akira Watanabe, Kayoko Tsukita, Knut Woltjen, Takuya Yamamoto, Akitsu Hotta, et al. 2017. "The Src/c-Abl Pathway Is a Potential Therapeutic Target in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Science Translational Medicine* 9 (391): eaaf3962. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf3962>.
- Inoue, Akane, Kiyoko Setoguchi, Yosuke Matsubara, Kumiko Okada, Nozomi Sato, Yoichiro Iwakura, Osamu Higuchi, and Yuji Yamanashi. 2009. "Dok-7 Activates the Muscle Receptor Kinase MuSK and Shapes Synapse Formation." *Science Signaling* 2 (59): ra7. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000113>.
- Ito, Hidetaka, Hervé Gaubert, Etienne Bucher, Marie Mirouze, Isabelle Vaillant, and Jerzy Paszkowski. 2011. "An siRNA Pathway Prevents Transgenerational Retrotransposition in Plants Subjected to Stress." *Nature* 472 (7341): 115–19. <https://doi.org/10.1038/nature09861>.
- Ito, Yasushi, Satoko Kumada, Akira Uchiyama, Kayoko Saito, Makiko Osawa, Akira Yagishita, Kiyoko Kurata, and Masaharu Hayashi. 2004. "Thalamic Lesions in a Long-Surviving Child with Spinal Muscular Atrophy Type I: MRI and EEG Findings." *Brain & Development* 26 (1): 53–56. [https://doi.org/10.1016/s0387-7604\(03\)00075-5](https://doi.org/10.1016/s0387-7604(03)00075-5).
- Iwahashi, Hiromi, Yutaka Eguchi, Noriko Yasuhara, Toshiaki Hanafusa, Yuji Matsuzawa, and Yoshihide Tsujimoto. 1997. "Synergistic Anti-Apoptotic Activity between Bcl-2 and SMN Implicated in Spinal Muscular Atrophy." *Nature* 390 (6658): 413–17. <https://doi.org/10.1038/37144>.
- Jablonka, S., and M. Sendtner. 2017. "Developmental Regulation of SMN Expression: Pathophysiological Implications and Perspectives for Therapy Development in Spinal Muscular Atrophy." *Gene Therapy* 24 (9): 506–13. <https://doi.org/10.1038/gt.2017.46>.
- Jablonka, Sibylle, Michael Bandilla, Stefan Wiese, Dirk Bühler, Brunhilde Wirth, Michael Sendtner, and Utz Fischer. 2001. "Co-Regulation of Survival of Motor Neuron (SMN) Protein and Its Interactor SIP1 during Development and in Spinal Muscular Atrophy." *Human Molecular Genetics* 10 (5): 497–505. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.5.497>.
- Jablonka, Sibylle, Kathrin Karle, Beatrice Sandner, Catia Andreassi, Katja von Au, and Michael Sendtner. 2006. "Distinct and Overlapping Alterations in Motor and Sensory Neurons in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy." *Human Molecular Genetics* 15 (3): 511–18. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi467>.
- Jablonka, Sibylle, Bertold Schrank, Martina Kralewski, Wilfried Rossoll, and Michael Sendtner. 2000. "Reduced Survival Motor Neuron (Smn) Gene Dose in Mice Leads to Motor Neuron Degeneration: An Animal Model for Spinal Muscular Atrophy Type III." *Human Molecular Genetics* 9 (3): 341–46. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.3.341>.
- Jangi, Mohini, Christina Fleet, Patrick Cullen, Shipra V. Gupta, Shila Mekhoubad, Eric Chiao, Norm Allaire, et al. 2017. "SMN Deficiency in Severe Models of Spinal Muscular Atrophy Causes Widespread Intron Retention and DNA Damage." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (12): E2347–56. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613181114>.
- Janzen, Eva, Natalia Mendoza-Ferreira, Seyyedmohsen Hosseinibarkooie, Svenja Schneider, Kristina Hupperich, Theresa Tschanz, Vanessa Grysko, et al. 2018. "CHP1 Reduction Ameliorates Spinal Muscular Atrophy Pathology by Restoring Calcineurin Activity and Endocytosis." *Brain* 141 (8): 2343–61. <https://doi.org/10.1093/brain/awy167>.
- Jezierska-Drutel, Agnieszka, Shireen Attaran, Barbara L. Hopkins, John J. Skoko, Steven A. Rosenzweig, and Carola A. Neumann. 2019. "The Peroxidase PRDX1 Inhibits the Activated Phenotype in Mammary Fibroblasts through Regulating C-Jun N-Terminal Kinases." *BMC Cancer* 19 (1): 812. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6031-4>.
- Jiang, Xiaoting, Annapoorna Kannan, and Laxman Gangwani. 2019. "ZPR1-Dependent Neurodegeneration Is Mediated by the JNK Signaling Pathway." *Journal of Experimental Neuroscience* 13 (January): 1179069519867915. <https://doi.org/10.1177/1179069519867915>.
- Jing, Hongyang, Peng Chen, Tiankun Hui, Zheng Yu, Jin Zhou, Erkang Fei, Shunqi Wang, Dongyan Ren, Xinsheng Lai, and Baoming Li. 2021. "Synapse-Specific Lrp4 mRNA Enrichment Requires Lrp4/MuSK Signaling, Muscle Activity and Wnt Non-Canonical Pathway." *Cell & Bioscience* 11 (1): 105. <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00619-z>.
- Jing, Lili, Julie L. Lefebvre, Laura R. Gordon, and Michael Granato. 2009. "Wnt Signals Organize Synaptic Prepattern and Axon Guidance through the Zebrafish Unplugged/MuSK Receptor." *Neuron* 61 (5): 721–33. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.12.025>.

- Jones, Ross A., Carl Harrison, Samantha L. Eaton, Maica Llaverro Hurtado, Laura C. Graham, Leena Alkhamash, Oladayo A. Oladiran, et al. 2017. "Cellular and Molecular Anatomy of the Human Neuromuscular Junction." *Cell Reports* 21 (9): 2348–56. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.008>.
- Jongh, Rianne de, Xandor M. Spijkers, Svetlana Pasteuning-Vuhman, Paul Vulto, and R. Jeroen Pasterkamp. 2021. "Neuromuscular Junction-on-a-Chip: ALS Disease Modeling and Read-out Development in Microfluidic Devices." *Journal of Neurochemistry* 157 (3): 393–412. <https://doi.org/10.1111/jnc.15289>.
- Jordan, C. L., and T. J. Williams. 2001. "Testosterone Regulates Terminal Schwann Cell Number and Junctional Size during Developmental Synapse Elimination." *Developmental Neuroscience* 23 (6): 441–51. <https://doi.org/10.1159/000048731>.
- Kaifer, Kevin A., Eric Villalón, Benjamin S. O'Brien, Samantha L. Sison, Caley E. Smith, Madeline E. Simon, Jose Marquez, et al. 2019. "AAV9-Mediated Delivery of MiR-23a Reduces Disease Severity in Smn2B/-SMA Model Mice." *Human Molecular Genetics* 28 (19): 3199–3210. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz142>.
- Kaifer, Kevin A., Eric Villalón, Erkan Y. Osman, Jacqueline J. Glascock, Laura L. Arnold, D. D. W. Cornelison, and Christian L. Lorson. 2017. "Plastin-3 Extends Survival and Reduces Severity in Mouse Models of Spinal Muscular Atrophy." *JCI Insight* 2 (5): e89970. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.89970>.
- Kaifer, Kevin A., Eric Villalón, Caley E. Smith, Madeline E. Simon, Jose Marquez, Abigail E. Hopkins, Toni I. Morcos, and Christian L. Lorson. 2020. "AAV9-DOK7 Gene Therapy Reduces Disease Severity in Smn2B/- SMA Model Mice." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 530 (1): 107–14. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.07.031>.
- Kang, Shin H., Ying Li, Masahiro Fukaya, Ileana Lorenzini, Don W. Cleveland, Lyle W. Ostrow, Jeffrey D. Rothstein, and Dwight E. Bergles. 2013. "Degeneration and Impaired Regeneration of Gray Matter Oligodendrocytes in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Nature Neuroscience* 16 (5): 571–79. <https://doi.org/10.1038/nn.3357>.
- Kaplan, Artem, Krista J. Spiller, Christopher Towne, Kevin C. Kanning, Ginn T. Choe, Adam Geber, Turgay Akay, Patrick Aebischer, and Christopher E. Henderson. 2014. "Neuronal Matrix Metalloproteinase-9 Is a Determinant of Selective Neurodegeneration." *Neuron* 81 (2): 333–48. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.009>.
- Kapur, Nitin, Sean Deegan, Ankit Parakh, and Leanne Gauld. 2019. "Relationship between Respiratory Function and Need for NIV in Childhood SMA." *Pediatric Pulmonology* 54 (11): 1774–80. <https://doi.org/10.1002/ppul.24455>.
- Kariya, Shingo, Teresa Obis, Caterina Garone, Turgay Akay, Fusako Sera, Shinichi Iwata, Shunichi Homma, and Umrao R. Monani. 2014. "Requirement of Enhanced Survival Motoneuron Protein Imposed during Neuromuscular Junction Maturation." *Journal of Clinical Investigation* 124 (2): 785–800. <https://doi.org/10.1172/JCI72017>.
- Kariya, Shingo, Gyu-Hwan Park, Yuka Maeno-Hikichi, Olga Leykekhman, Cathleen Lutz, Marc S. Arkovitz, Lynn T. Landmesser, and Umrao R. Monani. 2008. "Reduced SMN Protein Impairs Maturation of the Neuromuscular Junctions in Mouse Models of Spinal Muscular Atrophy." *Human Molecular Genetics* 17 (16): 2552–69. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn156>.
- Kashima, Tsuyoshi, Nishta Rao, Charles J. David, and James L. Manley. 2007. "HnRNP A1 Functions with Specificity in Repression of SMN2 Exon 7 Splicing." *Human Molecular Genetics* 16 (24): 3149–59. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm276>.
- Katz, B., and R. Miledi. 1965. "THE EFFECT OF CALCIUM ON ACETYLCHOLINE RELEASE FROM MOTOR NERVE TERMINALS." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 161 (February): 496–503. <https://doi.org/10.1098/rspb.1965.0017>.
- Kellermann, Kristine, Nadja Dertinger, Manfred Blobner, Frieder Kees, Eberhard F. Kochs, and Bettina Jungwirth. 2011. "Perioperative Moxifloxacin Treatment in Rats Subjected to Deep Hypothermic Circulatory Arrest: Reduction in Cerebral Inflammation but without Improvement in Cognitive Performance." *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 141 (3): 796–802. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2010.04.017>.
- Kesselheim, Aaron S., Jerry Avorn, and Ameet Sarpatwari. 2016. "The High Cost of Prescription Drugs in the United States: Origins and Prospects for Reform." *JAMA* 316 (8): 858–71. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.11237>.
- Kim, Daehwan, Geo Perte, Cole Trapnell, Harold Pimentel, Ryan Kelley, and Steven L. Salzberg. 2013. "TopHat2: Accurate Alignment of Transcriptomes in the Presence of Insertions, Deletions and Gene Fusions." *Genome Biology* 14 (4): R36. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-4-r36>.
- Kim, Dohoon, Chun-Hyung Kim, Jung-Il Moon, Young-Gie Chung, Mi-Yoon Chang, Baek-Soo Han, Sanghyeok Ko, et al. 2009. "Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins." *Cell Stem Cell* 4 (6): 472–76. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.005>.

- Kim, Eunhye, Fang Wu, Xuewen Wu, and Hyojung J Choo. 2020. "Generation of Craniofacial Myogenic Progenitor Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells for Skeletal Muscle Tissue Regeneration." *Biomaterials* 248 (July): 119995. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.119995>.
- Kim, Jeong-Ki, Charlotte Caine, Tomoyuki Awano, Ruth Herbst, and Umrao R. Monani. 2017. "Motor Neuronal Repletion of the NMJ Organizer, Agrin, Modulates the Severity of the Spinal Muscular Atrophy Disease Phenotype in Model Mice." *Human Molecular Genetics* 26 (13): 2377–85. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx124>.
- Kim, Jeong-Ki, Narendra N. Jha, Zhihua Feng, Michelle R. Faleiro, Claudia A. Chiriboga, Lan Wei-Lapierre, Robert T. Dirksen, Chien-Ping Ko, and Umrao R. Monani. 2020. "Muscle-Specific SMN Reduction Reveals Motor Neuron-Independent Disease in Spinal Muscular Atrophy Models." *The Journal of Clinical Investigation* 130 (3): 1271–87. <https://doi.org/10.1172/JCI131989>.
- Kim, Natalie, and Steven J. Burden. 2008. "MuSK Controls Where Motor Axons Grow and Form Synapses." *Nature Neuroscience* 11 (1): 19–27. <https://doi.org/10.1038/nn2026>.
- Kimbrel, Erin A., and Robert Lanza. 2020. "Next-Generation Stem Cells - Ushering in a New Era of Cell-Based Therapies." *Nature Reviews. Drug Discovery* 19 (7): 463–79. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0064-x>.
- Kimura, Hironobu, Masako Tada, Norio Nakatsujji, and Takashi Tada. 2004. "Histone Code Modifications on Pluripotential Nuclei of Reprogrammed Somatic Cells." *Molecular and Cellular Biology* 24 (13): 5710–20. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.13.5710-5720.2004>.
- Kleinman, Hynda K., Mary L. McGarvey, Lance A. Liotta, Pamela Gehron Robey, Karl Tryggvason, and George R. Martin. 1982. "Isolation and Characterization of Type IV Procollagen, Laminin, and Heparan Sulfate Proteoglycan from the EHS Sarcoma." *Biochemistry* 21 (24): 6188–93. <https://doi.org/10.1021/bi00267a025>.
- Ko, Chien-Ping, and Richard Robitaille. 2015. "Perisynaptic Schwann Cells at the Neuromuscular Synapse: Adaptable, Multitasking Glial Cells." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (10): a020503. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020503>.
- Kodaka, Yusaku, Gemachu Rabu, and Atsushi Asakura. 2017. "Skeletal Muscle Cell Induction from Pluripotent Stem Cells." *Stem Cells International* 2017: 1376151. <https://doi.org/10.1155/2017/1376151>.
- Koenen, Michael, Christoph Peter, Alfredo Villarroel, Veit Witzemann, and Bert Sakmann. 2005. "Acetylcholine Receptor Channel Subtype Directs the Innervation Pattern of Skeletal Muscle." *EMBO Reports* 6 (6): 570–76. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400429>.
- Kofoed, Eric M., and Russell E. Vance. 2012. "NAIPs: Building an Innate Immune Barrier against Bacterial Pathogens. NAIPs Function as Sensors That Initiate Innate Immunity by Detection of Bacterial Proteins in the Host Cell Cytosol." *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 34 (7): 589–98. <https://doi.org/10.1002/bies.201200013>.
- Kolb, Stephen J., and John T. Kissel. 2011. "Spinal Muscular Atrophy: A Timely Review." *Archives of Neurology* 68 (8): 979–84. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2011.74>.
- Kolb, Stephen J., and John T. Kissel. 2015. "Spinal Muscular Atrophy." *Neurologic Clinics* 33 (4): 831–46. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2015.07.004>.
- Kong, Lingling, David O. Valdivia, Christian M. Simon, Cera W. Hassinan, Nicolas Delestrée, Daniel M. Ramos, Jae Hong Park, et al. 2021. "Impaired Prenatal Motor Axon Development Necessitates Early Therapeutic Intervention in Severe SMA." *Science Translational Medicine* 13 (578): eabb6871. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abb6871>.
- Kong, Lingling, Xueyong Wang, Dong W. Choe, Michelle Polley, Barrington G. Burnett, Marta Bosch-Marcé, John W. Griffin, Mark M. Rich, and Charlotte J. Sumner. 2009. "Impaired Synaptic Vesicle Release and Immaturity of Neuromuscular Junctions in Spinal Muscular Atrophy Mice." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29 (3): 842–51. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4434-08.2009>.
- Konieczny, Piotr, and Rubén Artero. 2020. "Drosophila SMN2 Minigene Reporter Model Identifies Moxifloxacin as a Candidate Therapy for SMA." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 34 (2): 3021–36. <https://doi.org/10.1096/fj.201802554RRR>.
- Kroon, Evert, Laura A. Martinson, Kuniko Kadoya, Anne G. Bang, Olivia G. Kelly, Susan Eliazer, Holly Young, et al. 2008. "Pancreatic Endoderm Derived from Human Embryonic Stem Cells Generates Glucose-Responsive Insulin-Secreting Cells in Vivo." *Nature Biotechnology* 26 (4): 443–52. <https://doi.org/10.1038/nbt1393>.
- Kruzik, Anita, Damir Fetahagic, Bettina Hartlieb, Sebastian Dorn, Herwig Koppensteiner, Frank M. Horling, Friedrich Scheiflinger, Birgit M. Reipert, and Maurus de la Rosa. 2019. "Prevalence of Anti-Adeno-Associated Virus Immune Responses in International Cohorts of Healthy Donors." *Molecular Therapy*.

- Methods & Clinical Development* 14 (September). <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.05.014>.
- Kugelberg, E., and L. Welander. 1956. "Heredofamilial Juvenile Muscular Atrophy Simulating Muscular Dystrophy." *A.M.A. Archives of Neurology and Psychiatry* 75 (5): 500–509. <https://doi.org/10.1001/archneurpsyc.1956.02330230050005>.
- Kugelberg, Eric. 1947. "ELECTROMYOGRAMS IN MUSCULAR DISORDERS." *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 10 (3): 122–33. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC497104/>.
- Kummer, Terrance T., Thomas Misgeld, and Joshua R. Sanes. 2006. "Assembly of the Postsynaptic Membrane at the Neuromuscular Junction: Paradigm Lost." *Current Opinion in Neurobiology* 16 (1): 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.12.003>.
- Kunova, Michaela, Kamil Matulka, Livia Eiselleova, Anton Salykin, Iva Kubikova, Sergiy Kyrylenko, Ales Hampl, and Petr Dvorak. 2013. "Adaptation to Robust Monolayer Expansion Produces Human Pluripotent Stem Cells With Improved Viability." *Stem Cells Translational Medicine* 2 (4): 246–54. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0081>.
- Kuru, Satoshi, Motoko Sakai, Masaaki Konagaya, Mari Yoshida, Yoshio Hashizume, and Kayoko Saito. 2009. "An Autopsy Case of Spinal Muscular Atrophy Type III (Kugelberg-Welander Disease)." *Neuropathology: Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology* 29 (1): 63–67. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2008.00910.x>.
- Labianca, Luca, and Stuart L. Weinstein. 2019. "Scoliosis and Spinal Muscular Atrophy in the New World of Medical Therapy: Providing Lumbar Access for Intrathecal Treatment in Patients Previously Treated or Undergoing Spinal Instrumentation and Fusion." *Journal of Pediatric Orthopaedics B* 28 (4): 393–96. <https://doi.org/10.1097/BPB.0000000000000632>.
- Lai, Ying, Ucheor B. Choi, Jeremy Leitz, Hong Jun Rhee, Choongku Lee, Bekir Altas, Minglei Zhao, et al. 2017. "Molecular Mechanisms of Synaptic Vesicle Priming by Munc13 and Munc18." *Neuron* 95 (3): 591–607.e10. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.004>.
- Lamotte, Juliette Duchesne de, Jérôme Polentes, Florine Roussange, Léa Lesueur, Pauline Feurgard, Anselme Perrier, Camille Nicoleau, and Cécile Martinat. 2021. "Optogenetically Controlled Human Functional Motor Endplate for Testing Botulinum Neurotoxins." *Stem Cell Research & Therapy* 12 (1): 599. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02665-3>.
- Lancaster, Madeline A., and Juergen A. Knoblich. 2014. "Generation of Cerebral Organoids from Human Pluripotent Stem Cells." *Nature Protocols* 9 (10): 2329–40. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.158>.
- Landfeldt, Erik, Astrid Pechmann, Hugh J. McMillan, Hanns Lochmüller, and Thomas Sejersen. 2021. "Costs of Illness of Spinal Muscular Atrophy: A Systematic Review." *Applied Health Economics and Health Policy*, February. <https://doi.org/10.1007/s40258-020-00624-2>.
- Lauria, Fabio, Paola Bernabò, Toma Tebaldi, Ewout Joan Nicolaas Groen, Elena Perenthaler, Federica Maniscalco, Annalisa Rossi, et al. 2020. "SMN-Primed Ribosomes Modulate the Translation of Transcripts Related to Spinal Muscular Atrophy." *Nature Cell Biology* 22 (10): 1239–51. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-00577-7>.
- Laustriat, Delphine, Jacqueline Gide, Laetitia Barrault, Emilie Chautard, Clara Benoit, Didier Auboeuf, Anne Boland, et al. 2015. "In Vitro and In Vivo Modulation of Alternative Splicing by the Biguanide Metformin." *Molecular Therapy. Nucleic Acids* 4 (November): e262. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.35>.
- Le, Thanh T., Lan T. Pham, Matthew E. R. Butchbach, Honglai L. Zhang, Umrao R. Monani, Daniel D. Coovert, Tatiana O. Gavrulina, Lei Xing, Gary J. Bassell, and Arthur H. M. Burghes. 2005. "SMN $\Delta$ 7, the Major Product of the Centromeric Survival Motor Neuron (SMN2) Gene, Extends Survival in Mice with Spinal Muscular Atrophy and Associates with Full-Length SMN." *Human Molecular Genetics* 14 (6): 845–57. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi078>.
- Lee, Jui-Hao, Jen-Wei Liu, Shinn-Zong Lin, Horng-Jyh Harn, and Tzyy-Wen Chiou. 2018. "Advances in Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Shed Light on Drug Discovery for Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Cell Transplantation* 27 (9): 1301–12. <https://doi.org/10.1177/0963689718785154>.
- Lee, Young Il, Yue Li, Michelle Mikesh, Ian Smith, Klaus-Armin Nave, Markus H. Schwab, and Wesley J. Thompson. 2016. "Neuregulin1 Displayed on Motor Axons Regulates Terminal Schwann Cell-Mediated Synapse Elimination at Developing Neuromuscular Junctions." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (4): E479–487. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519156113>.
- Lee, Young Il, Michelle Mikesh, Ian Smith, Mendell Rimer, and Wesley Thompson. 2011. "Muscles in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy Show Profound Defects in Neuromuscular Development Even in the Absence of Failure in Neuromuscular Transmission or Loss of Motor Neurons." *Developmental Biology* 356 (2): 432–44. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.05.667>.

- Lee, Young, John Rudell, and Michael Ferns. 2009. "Rapsyn Interacts with the Muscle Acetylcholine Receptor via  $\alpha$ -Helical Domains in the  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\epsilon$  Subunit Intracellular Loops." *Neuroscience* 163 (1): 222–32. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.05.057>.
- Lefebvre, S., L. Bürglen, S. Reboullet, O. Clermont, P. Bulet, L. Viollet, B. Benichou, C. Cruaud, P. Millasseau, and M. Zeviani. 1995. "Identification and Characterization of a Spinal Muscular Atrophy-Determining Gene." *Cell* 80 (1): 155–65. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90460-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90460-3).
- Lefebvre, S., P. Bulet, Q. Liu, S. Bertrand, O. Clermont, A. Munnich, G. Dreyfuss, and J. Melki. 1997. "Correlation between Severity and SMN Protein Level in Spinal Muscular Atrophy." *Nature Genetics* 16 (3): 265–69. <https://doi.org/10.1038/ng0797-265>.
- Lefebvre, S., and C. Sarret. 2020. "Pathogenesis and Therapeutic Targets in Spinal Muscular Atrophy (SMA)." *Archives De Pediatrie: Organe Officiel De La Societe Francaise De Pediatrie* 27 (7S): 7S3–8. [https://doi.org/10.1016/S0929-693X\(20\)30269-4](https://doi.org/10.1016/S0929-693X(20)30269-4).
- Lefort, Nathalie, Anselme L. Perrier, Yacine Laâbi, Christine Varela, and Marc Peschanski. 2009. "Human Embryonic Stem Cells and Genomic Instability." *Regenerative Medicine* 4 (6): 899–909. <https://doi.org/10.2217/rme.09.63>.
- Leost, Maryse, Christiane Schultz, Andreas Link, Yong-Zhong Wu, Jacek Biernat, Eva-Maria Mandelkow, James A Bibb, et al. 2000. "Paullones Are Potent Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase-3b and Cyclin-Dependent Kinase 5/P25," 12.
- Lessard, Sarah J., Tara L. MacDonald, Prerana Pathak, Myoung Sook Han, Vernon G. Coffey, Johann Edge, Donato A. Rivas, Michael F. Hirshman, Roger J. Davis, and Laurie J. Goodyear. 2018. "JNK Regulates Muscle Remodeling via Myostatin/SMAD Inhibition." *Nature Communications* 9 (1): 3030. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05439-3>.
- Lewelt, Aga, Kristin J. Krosschell, Gregory J. Stoddard, Cindy Weng, Mei Xue, Robin L. Marcus, Eduard Gappmaier, et al. 2015. "Resistance Strength Training Exercise in Children with Spinal Muscular Atrophy." *Muscle & Nerve* 52 (4): 559–67. <https://doi.org/10.1002/mus.24568>.
- Li, Darrick K., Sarah Tisdale, Francesco Lotti, and Livio Pellizzoni. 2014. "SMN Control of RNP Assembly: From Post-Transcriptional Gene Regulation to Motor Neuron Disease." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 0 (August): 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.04.026>.
- Li, Hongxia, Sara K. Custer, Timra Gilson, Le Thi Hao, Christine E. Beattie, and Elliot J. Androphy. 2015. " $\alpha$ -COP Binding to the Survival Motor Neuron Protein SMN Is Required for Neuronal Process Outgrowth." *Human Molecular Genetics* 24 (25): 7295–7307. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv428>.
- Li, Lei, Wen-Cheng Xiong, and Lin Mei. 2018. "Neuromuscular Junction Formation, Aging, and Disorders." *Annual Review of Physiology* 80 (February): 159–88. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034255>.
- Lin, Chuang-Yu, Michiko Yoshida, Li-Tzu Li, Akihiro Ikenaka, Shiori Oshima, Kazuhiro Nakagawa, Hidetoshi Sakurai, Eriko Matsui, Tatsutoshi Nakahata, and Megumu K. Saito. 2019. "iPSC-Derived Functional Human Neuromuscular Junctions Model the Pathophysiology of Neuromuscular Diseases." *JCI Insight* 4 (18): e124299. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.124299>.
- Lin, Shuo, Lukas Landmann, Markus A. Ruegg, and Hans Rudolf Brenner. 2008. "The Role of Nerve- versus Muscle-Derived Factors in Mammalian Neuromuscular Junction Formation." *Journal of Neuroscience* 28 (13): 3333–40. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5590-07.2008>.
- Lin, Xiang, Jin-Jing Li, Wen-Jing Qian, Qi-Jie Zhang, Zhong-Feng Wang, Ying-Qian Lu, En-Lin Dong, 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 (26): 42030–42. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14925>.
- Ling, K. K. Y., R. M. Gibbs, Z. Feng, and C.-P. Ko. 2012. "Severe Neuromuscular Denervation of Clinically Relevant Muscles in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy." *Human Molecular Genetics* 21 (1): 185–95. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr453>.
- Ling, Karen K. Y., Ming-Yi Lin, Brian Zingg, Zhihua Feng, and Chien-Ping Ko. 2010. "Synaptic Defects in the Spinal and Neuromuscular Circuitry in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy." Edited by Lin Me. *PLoS ONE* 5 (11): e15457. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015457>.
- Lipnick, Scott L., Denis M. Agniel, Rahul Aggarwal, Nina R. Makhortova, Samuel G. Finlayson, Alexandra Brocato, Nathan Palmer, Basil T. Darras, Isaac Kohane, and Lee L. Rubin. 2019. "Systemic Nature of Spinal Muscular Atrophy Revealed by Studying Insurance Claims." *PloS One* 14 (3): e0213680. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213680>.
- Liu, Chun, Angelos Oikonomopoulos, Nazish Sayed, and Joseph C. Wu. 2018. "Modeling Human Diseases with Induced Pluripotent Stem Cells: From 2D to 3D and Beyond." *Development* 145 (5): dev156166. <https://doi.org/10.1242/dev.156166>.

- Liu, Hsiu-Yu, and Cathie M. Pflieger. 2013. "Mutation in E1, the Ubiquitin Activating Enzyme, Reduces *Drosophila* Lifespan and Results in Motor Impairment." *PloS One* 8 (1): e32835. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032835>.
- Liu, Huisheng, Jianfeng Lu, Hong Chen, Zhongwei Du, Xue-Jun Li, and Su-Chun Zhang. 2015. "Spinal Muscular Atrophy Patient-Derived Motor Neurons Exhibit Hyperexcitability." *Scientific Reports* 5 (July): 12189. <https://doi.org/10.1038/srep12189>.
- Liu, Q., and G. Dreyfuss. 1996. "A Novel Nuclear Structure Containing the Survival of Motor Neurons Protein." *The EMBO Journal* 15 (14): 3555–65.
- Liu, Q., U. Fischer, F. Wang, and G. Dreyfuss. 1997. "The Spinal Muscular Atrophy Disease Gene Product, SMN, and Its Associated Protein SIP1 Are in a Complex with Spliceosomal SnRNP Proteins." *Cell* 90 (6): 1013–21. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80367-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80367-0).
- Liu, Qiuyue, Steven C. Spusta, Ruifa Mi, Rhonda N. T. Lassiter, Michael R. Stark, Ahmet Höke, Mahendra S. Rao, and Xianmin Zeng. 2012. "Human Neural Crest Stem Cells Derived from Human ESCs and Induced Pluripotent Stem Cells: Induction, Maintenance, and Differentiation into Functional Schwann Cells." *Stem Cells Translational Medicine* 1 (4): 266–78. <https://doi.org/10.5966/sctm.2011-0042>.
- Loh, Yuin-Han, Odelya Hartung, Hu Li, Chunguang Guo, Julie M. Sahalie, Philip D. Manos, Achia Urbach, et al. 2010. "Reprogramming of T Cells from Human Peripheral Blood." *Cell Stem Cell* 7 (1): 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.004>.
- Long, Kimberly K, Karen M O'Shea, Ramzi J Khairallah, Kelly Howell, Sergey Paushkin, Karen S Chen, Shaun M Cote, et al. 2019. "Specific Inhibition of Myostatin Activation Is Beneficial in Mouse Models of SMA Therapy." *Human Molecular Genetics* 28 (7): 1076–89. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy382>.
- Lorson, C. L., E. Hahnen, E. J. Androphy, and B. Wirth. 1999. "A Single Nucleotide in the SMN Gene Regulates Splicing and Is Responsible for Spinal Muscular Atrophy." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (11): 6307–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6307>.
- Lorson, C. L., J. Strasswimmer, J. M. Yao, J. D. Baleja, E. Hahnen, B. Wirth, T. Le, A. H. Burghes, and E. J. Androphy. 1998. "SMN Oligomerization Defect Correlates with Spinal Muscular Atrophy Severity." *Nature Genetics* 19 (1): 63–66. <https://doi.org/10.1038/ng0598-63>.
- Lorson, Christian L., and Elliot J. Androphy. 2000. "An Exonic Enhancer Is Required for Inclusion of an Essential Exon in the SMA-Determining Gene SMN." *Human Molecular Genetics* 9 (2): 259–65. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.2.259>.
- Lukas, Thomas, and Teepu Siddique. 2019. "Cancer Drug Repurposing for Treating Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) (S5.004)." *Neurology* 92 (15 Supplement): S5.004.
- Lund, Riikka J., Elisa Närvä, and Riitta Lahesmaa. 2012. "Genetic and Epigenetic Stability of Human Pluripotent Stem Cells." *Nature Reviews. Genetics* 13 (10): 732–44. <https://doi.org/10.1038/nrg3271>.
- Lunn, Mitchell R., and Ching H. Wang. 2008. "Spinal Muscular Atrophy." *Lancet (London, England)* 371 (9630): 2120–33. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60921-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60921-6).
- Lutz, Cathleen M., Shingo Kariya, Sunita Patruni, Melissa A. Osborne, Don Liu, Christopher E. Henderson, Darrick K. Li, et al. 2011. "Postsymptomatic Restoration of SMN Rescues the Disease Phenotype in a Mouse Model of Severe Spinal Muscular Atrophy." *The Journal of Clinical Investigation* 121 (8): 3029–41. <https://doi.org/10.1172/JCI57291>.
- MacDonald, William Kim, David Hamilton, and Stefan Kuhle. 2014. "SMA Carrier Testing: A Meta-Analysis of Differences in Test Performance by Ethnic Group." *Prenatal Diagnosis* 34 (12): 1219–26. <https://doi.org/10.1002/pd.4459>.
- Madsen, Karen Lindhardt, Regitze Sølling Hansen, Nicolai Preisler, Frank Thøgersen, Martin Peter Berthelsen, and John Vissing. 2015. "Training Improves Oxidative Capacity, but Not Function, in Spinal Muscular Atrophy Type III." *Muscle & Nerve* 52 (2): 240–44. <https://doi.org/10.1002/mus.24527>.
- Maffioletti, Sara M., Mattia F. M. Gerli, Martina Ragazzi, Sumitava Dastidar, Sara Benedetti, Mariana Loperfido, Thierry VandenDriessche, Marinee K. Chuah, and Francesco Saverio Tedesco. 2015. "Efficient Derivation and Inducible Differentiation of Expandable Skeletal Myogenic Cells from Human ES and Patient-Specific IPS Cells." *Nature Protocols* 10 (7): 941–58. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.057>.
- Maffioletti, Sara Martina, Shilpita Sarcar, Alexander B.H. Henderson, Ingra Mannhardt, Luca Pinton, Louise Anne Moyle, Heather Steele-Stallard, et al. 2018. "Three-Dimensional Human iPSC-Derived Artificial Skeletal Muscles Model Muscular Dystrophies and Enable Multilineage Tissue Engineering." *Cell Reports* 23 (3): 899–908. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.091>.
- Makarev, Eugene, Kristen Fortney, Maria Litovchenko, Karl H. Braunewell, Alex Zhavoronkov, and Anthony Atala. 2015. "Quantifying Signaling Pathway Activation to Monitor the Quality of Induced Pluripotent Stem Cells." *Oncotarget* 6 (27): 23204–12. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4673>.

- Malik, Nasir, and Mahendra S. Rao. 2013. "A Review of the Methods for Human iPSC Derivation." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 997: 23–33. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-348-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-348-0_3).
- Mallinjou, Pierre, Jean-Philippe Villemin, Hussein Mortada, Micaela Polay Espinoza, François-Olivier Desmet, Samaan Samaan, Emilie Chautard, Léon-Charles Tranchevent, and Didier Auboeuf. 2014. "Endothelial, Epithelial, and Fibroblast Cells Exhibit Specific Splicing Programs Independently of Their Tissue of Origin." *Genome Research* 24 (3): 511–21. <https://doi.org/10.1101/gr.162933.113>.
- Mallon, Barbara S., Kye-Yoon Park, Kevin G. Chen, Rebecca S. Hamilton, and Ronald D. G. McKay. 2006. "Toward Xeno-Free Culture of Human Embryonic Stem Cells." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38 (7): 1063–75. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.12.014>.
- Malone, Daniel C., Rebecca Dean, Ramesh Arjunji, Ivar Jensen, Phil Cyr, Beckley Miller, Benit Maru, Douglas M. Sproule, Douglas E. Feltner, and Omar Dabbous. 2019. "Cost-Effectiveness Analysis of Using Onasemnogene Asepvoceq (AVXS-101) in Spinal Muscular Atrophy Type 1 Patients." *Journal of Market Access & Health Policy* 7 (1): 1601484. <https://doi.org/10.1080/20016689.2019.1601484>.
- Marchand, Sophie, Anne Devillers-Thiéry, Stéphanie Pons, Jean-Pierre Changeux, and Jean Cartaud. 2002. "Rapsyn Escorts the Nicotinic Acetylcholine Receptor Along the Exocytic Pathway via Association with Lipid Rafts." *Journal of Neuroscience* 22 (20): 8891–8901. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-20-08891.2002>.
- Markowitz, Jennifer A., Priyamvada Singh, and Basil T. Darras. 2012. "Spinal Muscular Atrophy: A Clinical and Research Update." *Pediatric Neurology* 46 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2011.09.001>.
- Markowitz, Jennifer A., Mindy B. Tinkle, and Kenneth H. Fischbeck. 2004. "Spinal Muscular Atrophy in the Neonate." *Journal of Obstetric, Gynecologic & Neonatal Nursing* 33 (1): 12–20. <https://doi.org/10.1177/0884217503261125>.
- Marshall, A., and L. W. Duchon. 1975. "Sensory System Involvement in Infantile Spinal Muscular Atrophy." *Journal of the Neurological Sciences* 26 (3): 349–59. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(75\)90207-5](https://doi.org/10.1016/0022-510x(75)90207-5).
- Marteyn, Antoine, Yves Maury, Morgane M. Gauthier, Camille Lecuyer, Remi Vernet, Jérôme A. Denis, Geneviève Pietu, Marc Peschanski, and Cécile Martinat. 2011. "Mutant Human Embryonic Stem Cells Reveal Neurite and Synapse Formation Defects in Type 1 Myotonic Dystrophy." *Cell Stem Cell* 8 (4): 434–44. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.02.004>.
- Martin, G. R. 1981. "Isolation of a Pluripotent Cell Line from Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma Stem Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (12): 7634–38. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7634>.
- Martinez, Enid E., Nicolle Quinn, Kayla Arouchon, Rocco Anzaldi, Stacey Tarrant, Nina S. Ma, John Griffin, Basil T. Darras, Robert J. Graham, and Nilesh M. Mehta. 2018. "Comprehensive Nutritional and Metabolic Assessment in Patients with Spinal Muscular Atrophy: Opportunity for an Individualized Approach." *Neuromuscular Disorders* 28 (6): 512–19. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2018.03.009>.
- Martinez, T. L., L. Kong, X. Wang, M. A. Osborne, M. E. Crowder, J. P. Van Meerbeke, X. Xu, et al. 2012. "Survival Motor Neuron Protein in Motor Neurons Determines Synaptic Integrity in Spinal Muscular Atrophy." *Journal of Neuroscience* 32 (25): 8703–15. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0204-12.2012>.
- Martínez-González, Loreto, Claudia Gonzalo-Consuegra, Marta Gómez-Almería, Gracia Porras, Eva de Lago, Ángeles Martín-Requero, and Ana Martínez. 2021. "Tideglusib, a Non-ATP Competitive Inhibitor of GSK-3 $\beta$  as a Drug Candidate for the Treatment of Amyotrophic Lateral Sclerosis." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (16): 8975. <https://doi.org/10.3390/ijms22168975>.
- Martínez-Hernández, Rebeca, Sara Bernal, Laura Alias, and Eduardo F. Tizzano. 2014. "Abnormalities in Early Markers of Muscle Involvement Support a Delay in Myogenesis in Spinal Muscular Atrophy." *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 73 (6): 559–67. <https://doi.org/10.1097/NEN.000000000000078>.
- Martínez-Hernández, Rebeca, Sara Bernal, Eva Also-Rallo, Laura Alías, MaJesús Barceló, Marta Hereu, Josep E Esquerda, and Eduardo F Tizzano. 2013. "Synaptic Defects in Type I Spinal Muscular Atrophy in Human Development: Synaptic Defects in Spinal Muscular Atrophy." *The Journal of Pathology* 229 (1): 49–61. <https://doi.org/10.1002/path.4080>.
- Martínez-Hernández, Rebeca, Carolina Soler-Botija, Eva Also, Laura Alias, Lidia Caselles, Ignasi Gich, Sara Bernal, and Eduardo F. Tizzano. 2009. "The Developmental Pattern of Myotubes in Spinal Muscular Atrophy Indicates Prenatal Delay of Muscle Maturation." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 68 (5): 474–81. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181a10ea1>.
- Maselli, Ricardo A., Juan Arredondo, Michael J. Ferns, and Robert L. Wollmann. 2012. "Synaptic Basal Lamina-Associated Congenital Myasthenic Syndromes." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1275 (1):



- 36–48. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06807.x>.
- Massenet, Séverine, Livio Pellizzoni, Sergey Paushkin, Iain W. Mattaj, and Gideon Dreyfuss. 2002. “The SMN Complex Is Associated with SnRNPs throughout Their Cytoplasmic Assembly Pathway.” *Molecular and Cellular Biology* 22 (18): 6533–41. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.18.6533-6541.2002>.
- Massoulié, Jean, and Charles B. Millard. 2009. “Cholinesterases and the Basal Lamina at Vertebrate Neuromuscular Junctions.” *Current Opinion in Pharmacology* 9 (3): 316–25. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.04.004>.
- Mastaglia, F. L., and J. N. Walton. 1971. “Histological and Histochemical Changes in Skeletal Muscle from Cases of Chronic Juvenile and Early Adult Spinal Muscular Atrophy (the Kugelberg-Welander Syndrome).” *Journal of the Neurological Sciences* 12 (1): 15–44. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(71\)90249-8](https://doi.org/10.1016/0022-510X(71)90249-8).
- Mateizel, I., N. De Temmerman, U. Ullmann, G. Cauffman, K. Sermon, H. Van de Velde, M. De Rycke, et al. 2006. “Derivation of Human Embryonic Stem Cell Lines from Embryos Obtained after IVF and after PGD for Monogenic Disorders.” *Human Reproduction (Oxford, England)* 21 (2): 503–11. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei345>.
- Matsuno, Motomi, Hiroyuki Kose, Masataka Okabe, and Yasushi Hiromi. 2007. “TFIIH Controls Developmentally-Regulated Cell Cycle Progression as a Holocomplex.” *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 12 (11): 1289–1300. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2007.01133.x>.
- Maury, Yves, Julien Côme, Rebecca A. Piskorowski, Nouzha Salah-Mohellibi, Vivien Chevalleyre, Marc Peschanski, Cécile Martinat, and Stéphane Nedelec. 2015. “Combinatorial Analysis of Developmental Cues Efficiently Converts Human Pluripotent Stem Cells into Multiple Neuronal Subtypes.” *Nature Biotechnology* 33 (1): 89–96. <https://doi.org/10.1038/nbt.3049>.
- Mazaleyrat, Kilian, Cherif Badja, Natacha Broucqsaut, Raphaël Chevalier, Camille Laberthonnière, Camille Dion, Lyla Baldasseroni, et al. 2020. “Multilineage Differentiation for Formation of Innervated Skeletal Muscle Fibers from Healthy and Diseased Human Pluripotent Stem Cells.” *Cells* 9 (6): 1531. <https://doi.org/10.3390/cells9061531>.
- Mazzoni, Esteban O, Shaun Mahony, Michael Closser, Carolyn A Morrison, Stephane Nedelec, Damian J Williams, Disi An, David K Gifford, and Hynek Wichterle. 2013. “Synergistic Binding of Transcription Factors to Cell-Specific Enhancers Programs Motor Neuron Identity.” *Nature Neuroscience* 16 (9): 1219–27. <https://doi.org/10.1038/nn.3467>.
- McCormack, Nikki M., Eric Villalón, Coralie Viollet, Anthony R. Soltis, Clifton L. Dalgard, Christian L. Lorson, and Barrington G. Burnett. 2021. “Survival Motor Neuron Deficiency Slows Myoblast Fusion through Reduced Myomaker and Myomixer Expression.” *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, June, jcs.12740. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12740>.
- McGovern, Vicki L., Aurélie Massoni-Laporte, Xueyong Wang, Thanh T. Le, Hao T. Le, Christine E. Beattie, Mark M. Rich, and Arthur H. M. Burghes. 2015. “Plastin 3 Expression Does Not Modify Spinal Muscular Atrophy Severity in the  $\Delta 7$  SMA Mouse.” *PLOS ONE* 10 (7): e0132364. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132364>.
- McGurk, Leanne, Amit Berson, and Nancy M. Bonini. 2015. “Drosophila as an In Vivo Model for Human Neurodegenerative Disease.” *Genetics* 201 (2): 377–402. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.179457>.
- McNeish, John, Jason P. Gardner, Brian J. Wainger, Clifford J. Woolf, and Kevin Eggan. 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 (1): 8–10. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.06.013>.
- McWhorter, Michelle L., Umrao R. Monani, Arthur H. M. Burghes, and Christine E. Beattie. 2003. “Knockdown of the Survival Motor Neuron (Smn) Protein in Zebrafish Causes Defects in Motor Axon Outgrowth and Pathfinding.” *The Journal of Cell Biology* 162 (5): 919–31. <https://doi.org/10.1083/jcb.200303168>.
- Meijer, L, M Flajolet, and P Greengard. 2004. “Pharmacological Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase 3.” *Trends in Pharmacological Sciences* 25 (9): 471–80. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.07.006>.
- Meister, G., D. Bühler, R. Pillai, F. Lottspeich, and U. Fischer. 2001. “A Multiprotein Complex Mediates the ATP-Dependent Assembly of Spliceosomal U SnRNPs.” *Nature Cell Biology* 3 (11): 945–49. <https://doi.org/10.1038/ncb1101-945>.
- Meldrum, Candice, Charles Scott, and Kathryn J. Swoboda. 2007. “Spinal Muscular Atrophy Genetic Counseling Access and Genetic Knowledge: Parents’ Perspectives.” *Journal of Child Neurology* 22 (8): 1019–26. <https://doi.org/10.1177/0883073807305672>.
- Melki, J., P. Sheth, S. Abdelhak, P. Burlet, M. F. Bachelot, J. Frézal, A. Munnich, and M. G. Lathrop. 1990. “Mapping of Acute (Type I) Spinal Muscular Atrophy to Chromosome 5q12-Q14.” *The Lancet*, Originally published as Volume 336, Issue 8710, 336 (8710): 271–73. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)91803-l](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)91803-l).
- Menasché, Philippe, Valérie Vanneaux, Albert Hagège, Alain Bel, Bernard Cholley, Alexandre Parouchev, Isabelle

- Cacciapuoti, et al. 2018. "Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiovascular Progenitors for Severe Ischemic Left Ventricular Dysfunction." *Journal of the American College of Cardiology* 71 (4): 429–38. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.11.047>.
- Mendell, Jerry R., Samiah Al-Zaidy, Richard Shell, W. Dave Arnold, Louise R. Rodino-Klapac, Thomas W. Prior, Linda Lowes, et al. 2017. "Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy." *New England Journal of Medicine* 377 (18): 1713–22. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706198>.
- Menduti, Giovanna, Daniela Maria Rasà, Serena Stanga, and Marina Boido. 2020. "Drug Screening and Drug Repositioning as Promising Therapeutic Approaches for Spinal Muscular Atrophy Treatment." *Frontiers in Pharmacology* 11 (November): 592234. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.592234>.
- Menke, Leonie A., Bwee Tien Poll-The, Sally-Ann Clur, Catia M. Bilardo, Allard C. van der Wal, Henny H. Lemmink, and Jan Maarten Cobben. 2008. "Congenital Heart Defects in Spinal Muscular Atrophy Type I: A Clinical Report of Two Siblings and a Review of the Literature." *American Journal of Medical Genetics Part A* 146A (6): 740–44. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32233>.
- Mentis, George Z., Dvir Blivis, Wenfang Liu, Estelle Drobac, Melissa E. Crowder, Lingling Kong, Francisco J. Alvarez, Charlotte J. Sumner, and Michael J. O'Donovan. 2011. "Early Functional Impairment of Sensory-Motor Connectivity in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy." *Neuron* 69 (3): 453–67. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.12.032>.
- Mercer, Eric A., Laura Korhonen, Ylva Skoglösa, Per-Anders Olsson, Jyrki P. Kukkonen, and Dan Lindholm. 2000. "NAIP Interacts with Hippocalcin and Protects Neurons against Calcium-Induced Cell Death through Caspase-3-Dependent and -Independent Pathways." *The EMBO Journal* 19 (14): 3597–3607. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.14.3597>.
- Mercuri, Eugenio. 2021. "Spinal Muscular Atrophy: From Rags to Riches." *Neuromuscular Disorders* 31 (10): 998–1003. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2021.08.009>.
- Mercuri, Eugenio, Enrico Bertini, Sonia Messina, Marco Pelliccioni, Adele D'Amico, Francesca Colitto, Massimiliano Mirabella, et al. 2004. "Pilot Trial of Phenylbutyrate in Spinal Muscular Atrophy." *Neuromuscular Disorders* 14 (2): 130–35. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2003.11.006>.
- Mercuri, Eugenio, Richard Finkel, Jacqueline Montes, Elena S. Mazzone, Maria Pia Sormani, Marion Main, Danielle Ramsey, et al. 2016. "Patterns of Disease Progression in Type 2 and 3 SMA: Implications for Clinical Trials." *Neuromuscular Disorders: NMD* 26 (2): 126–31. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2015.10.006>.
- Mercuri, Eugenio, Richard S. Finkel, Francesco Muntoni, Brunhilde Wirth, Jacqueline Montes, Marion Main, Elena S. Mazzone, et al. 2018. "Diagnosis and Management of Spinal Muscular Atrophy: Part 1: Recommendations for Diagnosis, Rehabilitation, Orthopedic and Nutritional Care." *Neuromuscular Disorders* 28 (2): 103–15. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2017.11.005>.
- Mercuri, Eugenio, Maria Carmela Pera, Mariacristina Scoto, Richard Finkel, and Francesco Muntoni. 2020. "Spinal Muscular Atrophy — Insights and Challenges in the Treatment Era." *Nature Reviews Neurology* 16 (12): 706–15. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-00413-4>.
- Mérien, Antoine, Julie Tahraoui-Bories, Michel Cailleret, Jean-Baptiste Dupont, Céline Leteur, Jérôme Polentes, Alexandre Carteron, et al. 2021. "CRISPR Gene Editing in Pluripotent Stem Cells Reveals the Function of MBNL Proteins during Human in Vitro Myogenesis." *Human Molecular Genetics*, July, ddab218. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddab218>.
- Merkle, Florian T., Sulagna Ghosh, Nolan Kamitaki, Jana Mitchell, Yishai Avior, Curtis Mello, Seva Kashin, et al. 2017. "Human Pluripotent Stem Cells Recurrently Acquire and Expand Dominant Negative P53 Mutations." *Nature* 545 (7653): 229–33. <https://doi.org/10.1038/nature22312>.
- Messéant, Julien, Alexandre Dobbertin, Emmanuelle Girard, Perrine Delers, Marin Manuel, Francesca Mangione, Alain Schmitt, et al. 2015. "MuSK Frizzled-Like Domain Is Critical for Mammalian Neuromuscular Junction Formation and Maintenance." *Journal of Neuroscience* 35 (12): 4926–41. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3381-14.2015>.
- Messéant, Julien, Jérôme Ezan, Perrine Delers, Konstantin Glebov, Carmen Marchiol, Franck Lager, Gilles Renault, et al. 2017. "Wnt Proteins Contribute to Neuromuscular Junction Formation through Distinct Signaling Pathways." *Development* 144 (9): 1712–24. <https://doi.org/10.1242/dev.146167>.
- Miguel-Aliaga, Irene, Yick Bun Chan, Kay E. Davies, and Marcel van den Heuvel. 2000. "Disruption of SMN Function by Ectopic Expression of the Human SMN Gene in *Drosophila*." *FEBS Letters* 486 (2): 99–102. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02243-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02243-2).
- Miller, Alyssa J., Briana R. Dye, Daysha Ferrer-Torres, David R. Hill, Arend W. Overeem, Lonnie D. Shea, and Jason R. Spence. 2019. "Generation of Lung Organoids from Human Pluripotent Stem Cells in Vitro." *Nature Protocols* 14 (2): 518–40. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0104-8>.

- Miller, R. A., and F. H. Ruddle. 1976. "Pluripotent Teratocarcinoma-Thymus Somatic Cell Hybrids." *Cell* 9 (1): 45–55. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(76\)90051-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(76)90051-9).
- Millino, Caterina, Marina Fanin, Andrea Vettori, Paolo Laveder, Maria Luisa Mostacciuolo, Corrado Angelini, and Gerolamo Lanfranchi. 2009. "Different Atrophy-Hypertrophy Transcription Pathways in Muscles Affected by Severe and Mild Spinal Muscular Atrophy." *BMC Medicine* 7 (1): 14. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-7-14>.
- Miyazawa, Atsuo, Yoshinori Fujiyoshi, and Nigel Unwin. 2003. "Structure and Gating Mechanism of the Acetylcholine Receptor Pore." *Nature* 423 (6943): 949–55. <https://doi.org/10.1038/nature01748>.
- Møller, P., N. Moe, O. D. Saugstad, K. Skullerud, M. Velken, K. Berg, S. Nitter-Hauge, and A.-L. Børresen. 1990. "Spinal Muscular Atrophy Type I Combined with Atrial Septal Defect in Three Sibs." *Clinical Genetics* 38 (2): 81–83. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1990.tb03553.x>.
- Monani, U. R., C. L. Lorson, D. W. Parsons, T. W. Prior, E. J. Androphy, A. H. Burghes, and J. D. McPherson. 1999. "A Single Nucleotide Difference That Alters Splicing Patterns Distinguishes the SMA Gene SMN1 from the Copy Gene SMN2." *Human Molecular Genetics* 8 (7): 1177–83. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.7.1177>.
- Monani, U. R., M. Sendtner, D. D. Covert, D. W. Parsons, C. Andreassi, T. T. Le, S. Jablonka, et al. 2000. "The Human Centromeric Survival Motor Neuron Gene (SMN2) Rescues Embryonic Lethality in Smn(-/-) Mice and Results in a Mouse with Spinal Muscular Atrophy." *Human Molecular Genetics* 9 (3): 333–39. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.3.333>.
- Monani, Umrao R., Matthew T. Pastore, Tatiana O. Gavrilina, Sibylle Jablonka, Thanh T. Le, Catia Andreassi, Jennifer M. DiCocco, et al. 2003. "A Transgene Carrying an A2G Missense Mutation in the SMN Gene Modulates Phenotypic Severity in Mice with Severe (Type I) Spinal Muscular Atrophy." *The Journal of Cell Biology* 160 (1): 41–52. <https://doi.org/10.1083/jcb.200208079>.
- Moradi, Sharif, Hamid Mahdizadeh, Tomo Šarić, Johnny Kim, Javad Harati, Hosein Shahsavarani, Boris Greber, and Joseph B. Moore. 2019. "Research and Therapy with Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs): Social, Legal, and Ethical Considerations." *Stem Cell Research & Therapy* 10 (1): 341. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1455-y>.
- Morales-Garcia, Jose A., Rosario Luna-Medina, Sandra Alonso-Gil, Marina Sanz-SanCristobal, Valle Palomo, Carmen Gil, Angel Santos, Ana Martinez, and Ana Perez-Castillo. 2012. "Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibition Promotes Adult Hippocampal Neurogenesis in Vitro and in Vivo." *ACS Chemical Neuroscience* 3 (11): 963–71. <https://doi.org/10.1021/cn300110c>.
- Moransard, Martijn, Lucia S. Borges, Raffaella Willmann, P. Angelo Marangi, Hans Rudolf Brenner, Michael J. Ferns, and Christian Fuhrer. 2003. "Agrin Regulates Rapsyn Interaction with Surface Acetylcholine Receptors, and This Underlies Cytoskeletal Anchoring and Clustering \*." *Journal of Biological Chemistry* 278 (9): 7350–59. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210865200>.
- Morgan, Steve, Paul Grootendorst, Joel Lexchin, Colleen Cunningham, and Devon Greyson. 2011. "The Cost of Drug Development: A Systematic Review." *Health Policy* 100 (1): 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.healthpol.2010.12.002>.
- Mouilleau, Vincent, Célia Vaslin, Rémi Robert, Simona Gribaudo, Nour Nicolas, Margot Jarrige, Angélique Terray, et al. 2021. "Dynamic Extrinsic Pacing of the HOX Clock in Human Axial Progenitors Controls Motor Neuron Subtype Specification." *Development* 148 (6). <https://doi.org/10.1242/dev.194514>.
- Moustakas, Aristidis, and Carl-Henrik Heldin. 2009. "The Regulation of TGFbeta Signal Transduction." *Development (Cambridge, England)* 136 (22): 3699–3714. <https://doi.org/10.1242/dev.030338>.
- Muhr, J., E. Graziano, S. Wilson, T. M. Jessell, and T. Edlund. 1999. "Convergent Inductive Signals Specify Midbrain, Hindbrain, and Spinal Cord Identity in Gastrula Stage Chick Embryos." *Neuron* 23 (4): 689–702. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(01\)80028-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(01)80028-3).
- Mukund, Kavitha, and Shankar Subramaniam. 2020. "Skeletal Muscle: A Review of Molecular Structure and Function, in Health and Disease." *WIREs Systems Biology and Medicine* 12 (1): e1462. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1462>.
- Mulleners, W. M., C. M. van Ravenswaay, F. J. Gabreëls, B. C. Hamel, A. van Oort, and R. C. Sengers. 1996. "Spinal Muscular Atrophy Combined with Congenital Heart Disease: A Report of Two Cases." *Neuropediatrics* 27 (6): 333–34. <https://doi.org/10.1055/s-2007-973805>.
- Munsat, T. L., and K. E. Davies. 1992. "International SMA Consortium Meeting. (26–28 June 1992, Bonn, Germany)." *Neuromuscular Disorders: NMD* 2 (5–6): 423–28. [https://doi.org/10.1016/s0960-8966\(06\)80015-5](https://doi.org/10.1016/s0960-8966(06)80015-5).
- Munsat, Theodore L. 1991. "International SMA Collaboration." *Neuromuscular Disorders* 1 (2): 81. [https://doi.org/10.1016/0960-8966\(91\)90052-T](https://doi.org/10.1016/0960-8966(91)90052-T).

- Muqit, M, J Moss, C Sewry, and R Lane. 2004. "Phenotypic Variability in Siblings with Type III Spinal Muscular Atrophy." *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 75 (12): 1762–64. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2003.018614>.
- Murayama, S., T. W. Bouldin, and K. Suzuki. 1991. "Immunocytochemical and Ultrastructural Studies of Werdnig-Hoffmann Disease." *Acta Neuropathologica* 81 (4): 408–17. <https://doi.org/10.1007/BF00293462>.
- Murdocca, Michela, Silvia Anna Ciafrè, Paola Spitalieri, Rosa Valentina Talarico, Massimo Sanchez, Giuseppe Novelli, and Federica Sanguolo. 2016. "SMA Human iPSC-Derived Motor Neurons Show Perturbed Differentiation and Reduced MiR-335-5p Expression." *International Journal of Molecular Sciences* 17 (8): E1231. <https://doi.org/10.3390/ijms17081231>.
- Murray, Lyndsay M., Ariane Beauvais, Kunal Bhanot, and Rashmi Kothary. 2013. "Defects in Neuromuscular Junction Remodelling in the Smn2B/- Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy." *Neurobiology of Disease* 49 (January): 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.08.019>.
- Murray, Lyndsay M., Ariane Beauvais, Sabrina Gibeault, Natalie L. Courtney, and Rashmi Kothary. 2015. "Transcriptional Profiling of Differentially Vulnerable Motor Neurons at Pre-Symptomatic Stage in the Smn 2b/- Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy." *Acta Neuropathologica Communications* 3 (1): 55. <https://doi.org/10.1186/s40478-015-0231-1>.
- Murray, Lyndsay M., Laura H. Comley, Derek Thomson, Nick Parkinson, Kevin Talbot, and Thomas H. Gillingwater. 2008. "Selective Vulnerability of Motor Neurons and Dissociation of Pre- and Post-Synaptic Pathology at the Neuromuscular Junction in Mouse Models of Spinal Muscular Atrophy." *Human Molecular Genetics* 17 (7): 949–62. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm367>.
- Murray, Lyndsay M., Sheena Lee, Dirk Bäumer, Simon H. Parson, Kevin Talbot, and Thomas H. Gillingwater. 2010. "Pre-Symptomatic Development of Lower Motor Neuron Connectivity in a Mouse Model of Severe Spinal Muscular Atrophy." *Human Molecular Genetics* 19 (3): 420–33. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp506>.
- Musi, Clara Alice, Graziella Agrò, Francesco Santarella, Erika Iervasi, and Tiziana Borsello. 2020. "JNK3 as Therapeutic Target and Biomarker in Neurodegenerative and Neurodevelopmental Brain Diseases." *Cells* 9 (10): 2190. <https://doi.org/10.3390/cells9102190>.
- Nachmansohn, D., and A. L. Machado. 1943. "The Formation of Acetylcholine. a New Enzyme: 'Choline Acetylase.'" *Journal of Neurophysiology* 6 (5): 397–403. <https://doi.org/10.1152/jn.1943.6.5.397>.
- Narver, Heather L., Lingling Kong, Barrington G. Burnett, Dong W. Choe, Marta Bosch-Marcé, Addis A. Taye, Michael A. Eckhaus, and Charlotte J. Sumner. 2008. "Sustained Improvement of Spinal Muscular Atrophy Mice Treated with Trichostatin A plus Nutrition." *Annals of Neurology* 64 (4): 465–70. <https://doi.org/10.1002/ana.21449>.
- Naryshkin, Nikolai A., Marla Weetall, Amal Dakka, Jana Narasimhan, Xin Zhao, Zhihua Feng, Karen K. Y. Ling, et al. 2014. "Motor Neuron Disease. SMN2 Splicing Modifiers Improve Motor Function and Longevity in Mice with Spinal Muscular Atrophy." *Science (New York, N.Y.)* 345 (6197): 688–93. <https://doi.org/10.1126/science.1250127>.
- Neher, Erwin, and Nils Brose. 2018. "Dynamically Primed Synaptic Vesicle States: Key to Understand Synaptic Short-Term Plasticity." *Neuron* 100 (6): 1283–91. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.11.024>.
- Ng, Shi-Yan, Boon Seng Soh, Natalia Rodriguez-Muela, David G. Hendrickson, Feodor Price, John L. Rinn, and Lee L. Rubin. 2015. "Genome-Wide RNA-Seq of Human Motor Neurons Implicates Selective ER Stress Activation in Spinal Muscular Atrophy." *Cell Stem Cell* 17 (5): 569–84. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.08.003>.
- Nichterwitz, Susanne, Jik Nijssen, Helena Storrval, Christoph Schweingruber, Laura Helen Comley, Ilary Allodi, Mirjam van der Lee, Qiaolin Deng, Rickard Sandberg, and Eva Hedlund. 2020. "LCM-Seq Reveals Unique Transcriptional Adaptation Mechanisms of Resistant Neurons and Identifies Protective Pathways in Spinal Muscular Atrophy." *Genome Research* 30 (8): 1083–96. <https://doi.org/10.1101/gr.265017.120>.
- Nicole, Sophie, Carmen Cifuentes Diaz, Tony Frugier, and Judith Melki. 2002. "Spinal Muscular Atrophy: Recent Advances and Future Prospects." *Muscle & Nerve* 26 (July): 4–13. <https://doi.org/10.1002/mus.10110>.
- Nicole, Sophie, Bénédicte Desforges, Gaele Millet, Jeanne Lesbordes, Carmen Cifuentes-Diaz, Dora Vertes, My Linh Cao, et al. 2003. "Intact Satellite Cells Lead to Remarkable Protection against Smn Gene Defect in Differentiated Skeletal Muscle." *Journal of Cell Biology* 161 (3): 571–82. <https://doi.org/10.1083/jcb.200210117>.
- Nijssen, Jik, Laura H. Comley, and Eva Hedlund. 2017. "Motor Neuron Vulnerability and Resistance in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Acta Neuropathologica* 133 (6): 863–85. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1708-8>.
- Nikolić, N., S. W. Görgens, G. H. Thoresen, V. Aas, J. Eckel, and K. Eckardt. 2017. "Electrical Pulse Stimulation of

- Cultured Skeletal Muscle Cells as a Model for in Vitro Exercise – Possibilities and Limitations.” *Acta Physiologica* 220 (3): 310–31. <https://doi.org/10.1111/apha.12830>.
- Nimchinsky, E. A., W. G. Young, G. Yeung, R. A. Shah, J. W. Gordon, F. E. Bloom, J. H. Morrison, and P. R. Hof. 2000. “Differential Vulnerability of Oculomotor, Facial, and Hypoglossal Nuclei in G86R Superoxide Dismutase Transgenic Mice.” *The Journal of Comparative Neurology* 416 (1): 112–25. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9861\(20000103\)416:1<112::aid-cne9>3.0.co;2-k](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(20000103)416:1<112::aid-cne9>3.0.co;2-k).
- Nishimune, Hiroshi, Joshua R. Sanes, and Steven S. Carlson. 2004. “A Synaptic Laminin–Calcium Channel Interaction Organizes Active Zones in Motor Nerve Terminals.” *Nature* 432 (7017): 580–87. <https://doi.org/10.1038/nature03112>.
- Nishinakamura, Ryuichi. 2019. “Human Kidney Organoids: Progress and Remaining Challenges.” *Nature Reviews. Nephrology* 15 (10): 613–24. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0176-x>.
- Nölle, Anna, Andre Zeug, Jeroen van Bergeijk, Lars Tönges, Ralf Gerhard, Hella Brinkmann, Sarah Al Rayes, et al. 2011. “The Spinal Muscular Atrophy Disease Protein SMN Is Linked to the Rho-Kinase Pathway via Profilin.” *Human Molecular Genetics* 20 (24): 4865–78. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr425>.
- Nordström, Ulrika, Thomas M. Jessell, and Thomas Edlund. 2002. “Progressive Induction of Caudal Neural Character by Graded Wnt Signaling.” *Nature Neuroscience* 5 (6): 525–32. <https://doi.org/10.1038/nn0602-854>.
- Nordström, Ulrika, Esther Maier, Thomas M. Jessell, and Thomas Edlund. 2006. “An Early Role for Wnt Signaling in Specifying Neural Patterns of Cdx and Hox Gene Expression and Motor Neuron Subtype Identity.” *PLOS Biology* 4 (8): e252. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040252>.
- Nosengo, Nicola. 2016. “Can You Teach Old Drugs New Tricks?” *Nature* 534 (7607): 314–16. <https://doi.org/10.1038/534314a>.
- Nunes, Sara S., Jason W. Miklas, Jie Liu, Roozbeh Aschar-Sobbi, Yun Xiao, Boyang Zhang, Jiahua Jiang, et al. 2013. “Biowire: A Platform for Maturation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes.” *Nature Methods* 10 (8): 781–87. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2524>.
- Oates, Emily C., Stephen Reddel, Michael L. Rodriguez, Luke C. Gandolfo, Melanie Bahlo, Simon H. Hawke, Shireen R. Lamandé, Nigel F. Clarke, and Kathryn N. North. 2012. “Autosomal Dominant Congenital Spinal Muscular Atrophy: A True Form of Spinal Muscular Atrophy Caused by Early Loss of Anterior Horn Cells.” *Brain: A Journal of Neurology* 135 (Pt 6): 1714–23. <https://doi.org/10.1093/brain/aws108>.
- Ogawa, Chihiro, Kengo Usui, Fuyu Ito, Masayoshi Itoh, Yoshihide Hayashizaki, and Harukazu Suzuki. 2009. “Role of Survival Motor Neuron Complex Components in Small Nuclear Ribonucleoprotein Assembly.” *The Journal of Biological Chemistry* 284 (21): 14609–17. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809031200>.
- Ogino, Shuji, and Robert B. Wilson. 2002. “Genetic Testing and Risk Assessment for Spinal Muscular Atrophy (SMA).” *Human Genetics* 111 (6): 477–500. <https://doi.org/10.1007/s00439-002-0828-x>.
- Ohgushi, Masatoshi, Michiru Matsumura, Mototsugu Eiraku, Kazuhiro Murakami, Toshihiro Aramaki, Ayaka Nishiyama, Keiko Muguruma, et al. 2010. “Molecular Pathway and Cell State Responsible for Dissociation-Induced Apoptosis in Human Pluripotent Stem Cells.” *Cell Stem Cell* 7 (2): 225–39. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.018>.
- Ohi, Yuki, Han Qin, Chibo Hong, Laure Blouin, Jose M. Polo, Tingxia Guo, Zhongxia Qi, et al. 2011. “Incomplete DNA Methylation Underlies a Transcriptional Memory of the Somatic Cell in Human IPS Cells.” *Nature Cell Biology* 13 (5): 541–49. <https://doi.org/10.1038/ncb2239>.
- Ohuchi, Kazuki, Michinori Funato, Zenichiro Kato, Junko Seki, Chizuru Kawase, Yuya Tamai, Yoko Ono, et al. 2016. “Established Stem Cell Model of Spinal Muscular Atrophy Is Applicable in the Evaluation of the Efficacy of Thyrotropin-Releasing Hormone Analog: SMA-IPSC Model for TRH Therapy.” *STEM CELLS Translational Medicine* 5 (2): 152–63. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0059>.
- Ojala, Kristine S., Emily J. Reedich, Christine J. DiDonato, and Stephen D. Meriney. 2021. “In Search of a Cure: The Development of Therapeutics to Alter the Progression of Spinal Muscular Atrophy.” *Brain Sciences* 11 (2): 194. <https://doi.org/10.3390/brainsci11020194>.
- Okada, Kumiko, Akane Inoue, Momoko Okada, Yoji Murata, Shigeru Kakuta, Takafumi Jigami, Sachiko Kubo, et al. 2006. “The Muscle Protein Dok-7 Is Essential for Neuromuscular Synaptogenesis.” *Science (New York, N.Y.)* 312 (5781): 1802–5. <https://doi.org/10.1126/science.1127142>.
- Oldershaw, Rachel A., Melissa A. Baxter, Emma T. Lowe, Nicola Bates, Lisa M. Grady, Francesca Soncin, Daniel R. Brison, Timothy E. Hardingham, and Susan J. Kimber. 2010. “Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells toward Chondrocytes.” *Nature Biotechnology* 28 (11): 1187–94. <https://doi.org/10.1038/nbt.1683>.
- Olsson, Bob, Lars Alberg, Nicholas C. Cullen, Eva Michael, Lisa Wahlgren, Anna-Karin Kroksmark, Kevin Rostasy, Kaj Blennow, Henrik Zetterberg, and Már Tulinius. 2019. “NFL Is a Marker of Treatment Response in

- Children with SMA Treated with Nusinersen.” *Journal of Neurology* 266 (9): 2129–36. <https://doi.org/10.1007/s00415-019-09389-8>.
- Oprea, Gabriela E., Sandra Kröber, Michelle L. McWhorter, Wilfried Rossoll, Stefan Müller, Michael Krawczak, Gary J. Bassell, Christine E. Beattie, and Brunhilde Wirth. 2008. “Plastin 3 Is a Protective Modifier of Autosomal Recessive Spinal Muscular Atrophy.” *Science (New York, N.Y.)* 320 (5875): 524–27. <https://doi.org/10.1126/science.1155085>.
- Osaki, Tatsuya, Sebastien G. M. Uzel, and Roger D. Kamm. 2018. “Microphysiological 3D Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) from Human IPS-Derived Muscle Cells and Optogenetic Motor Neurons.” *Science Advances* 4 (10): eaat5847. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aat5847>.
- Osborne, Melissa, Daniel Gomez, Zihua Feng, Corissa McEwen, Jose Beltran, Kim Cirillo, Bassem El-Khodori, et al. 2012. “Characterization of Behavioral and Neuromuscular Junction Phenotypes in a Novel Allelic Series of SMA Mouse Models.” *Human Molecular Genetics* 21 (20): 4431–47. <https://doi.org/10.1093/hmg/dd285>.
- Oskoui, Maryam, Pamela Ng, Stephen Liben, and David Zielinski. 2017. “Physician Driven Variation in the Care of Children with Spinal Muscular Atrophy Type 1.” *Pediatric Pulmonology* 52 (5): 662–68. <https://doi.org/10.1002/ppul.23616>.
- Otter, Simon, Matthias Grimmmler, Nils Neuenkirchen, Ashwin Chari, Albert Sickmann, and Utz Fischer. 2007. “A Comprehensive Interaction Map of the Human Survival of Motor Neuron (SMN) Complex.” *The Journal of Biological Chemistry* 282 (8): 5825–33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608528200>.
- Ottesen, Eric W., Matthew D. Howell, Natalia N. Singh, Joonbae Seo, Elizabeth M. Whitley, and Ravindra N. Singh. 2016. “Severe Impairment of Male Reproductive Organ Development in a Low SMN Expressing Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy.” *Scientific Reports* 6 (1): 20193. <https://doi.org/10.1038/srep20193>.
- Ottesen, Eric W, Natalia N Singh, Diou Luo, and Ravindra N Singh. 2018. “High-Affinity RNA Targets of the Survival Motor Neuron Protein Reveal Diverse Preferences for Sequence and Structural Motifs.” *Nucleic Acids Research* 46 (20): 10983–1. <https://doi.org/10.1093/nar/gky770>.
- Oury, Julien, Yun Liu, Ana Töpf, Slobodanka Todorovic, Esthelle Hoedt, Veeramani Preethish-Kumar, Thomas A. Neubert, Weichun Lin, Hanns Lochmüller, and Steven J. Burden. 2019. “MACF1 Links Rapsyn to Microtubule- and Actin-Binding Proteins to Maintain Neuromuscular Synapses.” *The Journal of Cell Biology* 218 (5): 1686–1705. <https://doi.org/10.1083/jcb.201810023>.
- Paez-Colasante, Ximena, Bonnie Seaberg, Tara L. Martinez, Lingling Kong, Charlotte J. Sumner, and Mendell Rimer. 2013. “Improvement of Neuromuscular Synaptic Phenotypes without Enhanced Survival and Motor Function in Severe Spinal Muscular Atrophy Mice Selectively Rescued in Motor Neurons.” Edited by Thomas H. Gillingwater. *PLoS ONE* 8 (9): e75866. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075866>.
- Palacino, James, Susanne E. Swalley, Cheng Song, Atwood K. Cheung, Lei Shu, Xiaolu Zhang, Mailin Van Hoosear, et al. 2015. “SMN2 Splice Modulators Enhance U1-Pre-mRNA Association and Rescue SMA Mice.” *Nature Chemical Biology* 11 (7): 511–17. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1837>.
- Palladino, Alberto, Luigia Passamano, Antonella Taglia, Paola D’Ambrosio, Marianna Scutifero, Maria Rosaria Cecio, Esther Picillo, et al. 2011. “Cardiac Involvement in Patients with Spinal Muscular Atrophies.” *Acta Myologica: Myopathies and Cardiomyopathies: Official Journal of the Mediterranean Society of Myology* 30 (3): 175–78.
- Palomo, Valle, Daniel I. Perez, Carlos Roca, Cara Anderson, Natalia Rodríguez-Muela, Concepción Perez, Jose A. Morales-Garcia, et al. 2017. “Subtly Modulating Glycogen Synthase Kinase 3  $\beta$ : Allosteric Inhibitor Development and Their Potential for the Treatment of Chronic Diseases.” *Journal of Medicinal Chemistry* 60 (12): 4983–5001. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00395>.
- Park, Gyu-Hwan, Yuka Maeno-Hikichi, Tomoyuki Awano, Lynn T. Landmesser, and Umrao R. Monani. 2010. “Reduced Survival of Motor Neuron (SMN) Protein in Motor Neuronal Progenitors Functions Cell Autonomously to Cause Spinal Muscular Atrophy in Model Mice Expressing the Human Centromeric (SMN2) Gene.” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (36): 12005–19. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2208-10.2010>.
- Passini, Marco A., Jie Bu, Amy M. Richards, Cathrine Kinnecom, S. Pablo Sardi, Lisa M. Stanek, Yimin Hua, et al. 2011. “Antisense Oligonucleotides Delivered to the Mouse CNS Ameliorate Symptoms of Severe Spinal Muscular Atrophy.” *Science Translational Medicine* 3 (72): 72ra18. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001777>.
- Pearn, J. 1978. “Incidence, Prevalence, and Gene Frequency Studies of Chronic Childhood Spinal Muscular Atrophy.” *Journal of Medical Genetics* 15 (6): 409–13. <https://doi.org/10.1136/jmg.15.6.409>.
- Pearn, J. H., C. O. Carter, and J. Wilson. 1973. “The Genetic Identity of Acute Infantile Spinal Muscular Atrophy.” *Brain*, 463–70.

- Pelkmans, Lucas, and Ari Helenius. 2002. "Endocytosis via Caveolae." *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 3 (5): 311–20. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.30501.x>.
- Pellizzoni, L., J. Baccon, B. Charroux, and G. Dreyfuss. 2001. "The Survival of Motor Neurons (SMN) Protein Interacts with the SnRNP Proteins Fibrillarin and GAR1." *Current Biology: CB* 11 (14): 1079–88. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00316-5](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00316-5).
- Pellizzoni, Livio. 2007. "Chaperoning Ribonucleoprotein Biogenesis in Health and Disease." *EMBO Reports* 8 (4): 340–45. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400941>.
- Pellizzoni, Livio, Jeongsik Yong, and Gideon Dreyfuss. 2002. "Essential Role for the SMN Complex in the Specificity of SnRNP Assembly." *Science*, November. <https://doi.org/10.1126/science.1074962>.
- Pera, Maria Carmela, Marco Luigetti, Marika Pane, Giorgia Coratti, Nicola Forcina, Lavinia Fanelli, Elena S. Mazzone, et al. 2017. "6MWT Can Identify Type 3 SMA Patients with Neuromuscular Junction Dysfunction." *Neuromuscular Disorders: NMD* 27 (10): 879–82. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2017.07.007>.
- Pereira, João D., Daniel M. DuBreuil, Anna-Claire Devlin, Aaron Held, Yechiam Sapir, Eugene Berezovski, James Hawrot, Katherine Dorfman, Vignesh Chander, and Brian J. Wainger. 2021. "Human Sensorimotor Organoids Derived from Healthy and Amyotrophic Lateral Sclerosis Stem Cells Form Neuromuscular Junctions." *Nature Communications* 12 (1): 4744. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24776-4>.
- Periyakarupiah, Ambika, Sandra de la Fuente, Saravanan Arumugam, Núria Bahí, Ana Garcera, and Rosa M. Soler. 2016. "Autophagy Modulators Regulate Survival Motor Neuron Protein Stability in Motoneurons." *Experimental Neurology* 283 (September): 287–97. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.06.032>.
- Perrier, Anselme L., Viviane Tabar, Tiziano Barberi, Maria E. Rubio, Juan Bruses, Norbert Topf, Neil L. Harrison, and Lorenz Studer. 2004. "Derivation of Midbrain Dopamine Neurons from Human Embryonic Stem Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (34): 12543–48. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404700101>.
- Peter, Cyril Jayakumar, Matthew Evans, Venugopal Thayanithy, Naoko Taniguchi-Ishigaki, Ingolf Bach, Adrienne Kolpak, Gary J. Bassell, et al. 2011. "The COPI Vesicle Complex Binds and Moves with Survival Motor Neuron within Axons." *Human Molecular Genetics* 20 (9): 1701–11. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr046>.
- Petit, Florence, Jean-Marie Cuisset, Nathalie Rouaix-Emery, Claude Cancés, Bernard Sablonnière, Eric Bieth, Alexandre Moerman, et al. 2011. "Insights into Genotype–Phenotype Correlations in Spinal Muscular Atrophy: A Retrospective Study of 103 Patients." *Muscle & Nerve* 43 (1): 26–30. <https://doi.org/10.1002/mus.21832>.
- Petrov, Konstantin A., Emmanuelle Girard, Alexandra D. Nikitashina, Cesare Colasante, Véronique Bernard, Leniz Nurullin, Jacqueline Leroy, et al. 2014. "Schwann Cells Sense and Control Acetylcholine Spillover at the Neuromuscular Junction by A7 Nicotinic Receptors and Butyrylcholinesterase." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 34 (36): 11870–83. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0329-14.2014>.
- Petrov, Konstantin A., Evgeny E. Nikolsky, and Patrick Masson. 2018. "Autoregulation of Acetylcholine Release and Micro-Pharmacodynamic Mechanisms at Neuromuscular Junction: Selective Acetylcholinesterase Inhibitors for Therapy of Myasthenic Syndromes." *Frontiers in Pharmacology* 9 (July): 766. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00766>.
- Philippidou, Polyxeni, and Jeremy S. Dasen. 2013. "Hox Genes: Choreographers in Neural Development, Architects of Circuit Organization." *Neuron* 80 (1): 12–34. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.09.020>.
- Picchiarelli, Gina, Maria Demestre, Amila Zuko, Marije Been, Julia Higelin, Stéphane Dieterlé, Marc-Antoine Goy, et al. 2019. "FUS-Mediated Regulation of Acetylcholine Receptor Transcription at Neuromuscular Junctions Is Compromised in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Nature Neuroscience* 22 (11): 1793–1805. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0498-9>.
- Pilato, Celeste M., Jae Hong Park, Lingling Kong, Constantin d'Ydewalle, David Valdivia, Karen S. Chen, Irene Griswold-Prenner, and Charlotte J. Sumner. 2019. "Motor Neuron Loss in SMA Is Not Associated with Somal Stress-Activated JNK/c-Jun Signaling." *Human Molecular Genetics* 28 (19): 3282–92. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz150>.
- Piras, Antonio, Lorenzo Schiaffino, Marina Boido, Valeria Valsecchi, Michela Guglielmo, Elena De Amicis, Julien Puyal, et al. 2017. "Inhibition of Autophagy Delays Motoneuron Degeneration and Extends Lifespan in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy." *Cell Death & Disease* 8 (12): 3223. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0086-4>.
- Pla, Patrick, Marie-Rose Hirsch, Stéphane Le Crom, Simone Reiprich, Vincent R Harley, and Christo Goridis. 2008.

- “Identification of Phox2b-Regulated Genes by Expression Profiling of Cranial Motoneuron Precursors.” *Neural Development* 3 (1): 14. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-3-14>.
- Poliak, Sebastian, Daniel Morales, Louis-Philippe Croteau, Dayana Krawchuk, Elena Palmesino, Susan Morton, Jean-François Cloutier, et al. 2015. “Synergistic Integration of Netrin and Ephrin Axon Guidance Signals by Spinal Motor Neurons.” Edited by Graeme W Davis. *ELife* 4 (December): e10841. <https://doi.org/10.7554/eLife.10841>.
- Porensky, Paul N., Chalermchai Mitrpant, Vicki L. McGovern, Adam K. Bevan, Kevin D. Foust, Brain K. Kaspar, Stephen D. Wilton, and Arthur H. M. Burghes. 2012. “A Single Administration of Morpholino Antisense Oligomer Rescues Spinal Muscular Atrophy in Mouse.” *Human Molecular Genetics* 21 (7): 1625–38. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr600>.
- Pourquié, Olivier, Ziad Al Tanoury, and Jérôme Chal. 2018. “The Long Road to Making Muscle In Vitro.” *Current Topics in Developmental Biology* 129: 123–42. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.03.003>.
- Pourtoy-Brasselet, Sandra, Axel Sciauvaud, Maria-Gabriela Boza-Moran, Michel Cailleret, Margot Jarrige, Hélène Polvèche, Jérôme Polentes, et al. 2021. “Human iPSC-Derived Neurons Reveal Early Developmental Alteration of Neurite Outgrowth in the Late-Occurring Neurodegenerative Wolfram Syndrome.” *The American Journal of Human Genetics* 108 (11): 2171–85. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.10.001>.
- Powis, Rachael A., and Thomas H. Gillingwater. 2016. “Selective Loss of Alpha Motor Neurons with Sparing of Gamma Motor Neurons and Spinal Cord Cholinergic Neurons in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy.” *Journal of Anatomy* 228 (3): 443–51. <https://doi.org/10.1111/joa.12419>.
- Powis, Rachael A., Evangelia Karyka, Penelope Boyd, Julien Côme, Ross A. Jones, Yinan Zheng, Eva Szunyogova, et al. 2016. “Systemic Restoration of UBA1 Ameliorates Disease in Spinal Muscular Atrophy.” *JCI Insight* 1 (11). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.87908>.
- Prior, Thomas W., Adrian R. Krainer, Yimin Hua, Kathryn J. Swoboda, Pamela C. Snyder, Scott J. Bridgeman, Arthur H. M. Burghes, and John T. Kissel. 2009. “A Positive Modifier of Spinal Muscular Atrophy in the SMN2 Gene.” *American Journal of Human Genetics* 85 (3): 408–13. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.08.002>.
- Puttonen, Katja A., Marika Ruponen, Nikolay Naumenko, Outi H. Hovatta, Pasi Tavi, and Jari Koistinaho. 2015. “Generation of Functional Neuromuscular Junctions from Human Pluripotent Stem Cell Lines.” *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9 (December): 473. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00473>.
- Qiu, Zhenyu, Hongxia Yuan, Na Li, Xinjuan Yang, Xuemei Hu, Fengtai Su, and Baiyi Chen. 2018. “Bidirectional Effects of Moxifloxacin on the Pro-inflammatory Response in Lipopolysaccharide-stimulated Mouse Peritoneal Macrophages.” *Molecular Medicine Reports*, October. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9569>.
- Querin, Giorgia, Mohamed-Mounir El Mendili, Timothée Lenglet, Anthony Behin, Tanya Stojkovic, François Salachas, David Devos, et al. 2018. “The Spinal and Cerebral Profile of Adult Spinal-Muscular Atrophy: A Multimodal Imaging Study.” *NeuroImage: Clinical* 21 (November): 101618. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2018.101618>.
- Rademacher, Sebastian. 2017. “Cytoskeletal Dysregulation in the Motoneuron Disease Spinal Muscular Atrophy (SMA).” [https://elib.tiho-hannover.de/dissertations/rademachers\\_ss17](https://elib.tiho-hannover.de/dissertations/rademachers_ss17).
- Radtke, Kendra K, Anneke C Hesseling, J L Winckler, Heather R Draper, Belen P Solans, Stephanie Thee, Lubbe Wiesner, et al. 2021. “Moxifloxacin Pharmacokinetics, Cardiac Safety, and Dosing for the Treatment of Rifampicin-Resistant Tuberculosis in Children.” *Clinical Infectious Diseases*, July, ciab641. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab641>.
- Rajendra, T. K., Graydon B. Gonsalvez, Michael P. Walker, Karl B. Shpargel, Helen K. Salz, and A. Gregory Matera. 2007. “A *Drosophila Melanogaster* Model of Spinal Muscular Atrophy Reveals a Function for SMN in Striated Muscle.” *The Journal of Cell Biology* 176 (6): 831–41. <https://doi.org/10.1083/jcb.200610053>.
- Ramos, Daniel M., Constantin d’Ydewalle, Vijayalakshmi Gabbeta, Amal Dakka, Stephanie K. Klein, Daniel A. Norris, John Matson, et al. 2019. “Age-Dependent SMN Expression in Disease-Relevant Tissue and Implications for SMA Treatment.” *Journal of Clinical Investigation* 129 (11): 4817–31. <https://doi.org/10.1172/JCI124120>.
- Ramser, Juliane, Mary Ellen Ahearn, Claus Lenski, Kemal O. Yariz, Heide Hellebrand, Michael von Rhein, Robin D. Clark, et al. 2008. “Rare Missense and Synonymous Variants in UBE1 Are Associated with X-Linked Infantile Spinal Muscular Atrophy.” *American Journal of Human Genetics* 82 (1): 188–93. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.09.009>.
- Rao, Tata Purushothama, and Michael Kühl. 2010. “An Updated Overview on Wnt Signaling Pathways: A Prelude for More.” *Circulation Research* 106 (12): 1798–1806. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.219840>.



- Rao, Vamshi K., Daniel Kapp, and Mary Schroth. 2018. "Gene Therapy for Spinal Muscular Atrophy: An Emerging Treatment Option for a Devastating Disease." *Journal of Managed Care & Specialty Pharmacy* 24 (12-a Suppl): S3–16. <https://doi.org/10.18553/jmcp.2018.24.12-a.s3>.
- Ratni, Hasane, Martin Ebeling, John Baird, Stefanie Bendels, Johan Bylund, Karen S. Chen, Nora Denk, 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)." *Journal of Medicinal Chemistry* 61 (15): 6501–17. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00741>.
- Ravi, Bhavya, Michelle Harran Chan-Cortés, and Charlotte J. Sumner. 2021. "Gene-Targeting Therapeutics for Neurological Disease: Lessons Learned from Spinal Muscular Atrophy." *Annual Review of Medicine* 72 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-070119-115459>.
- Renvoisé, Benoît, Kevinee Khoobarry, Marie-Claude Gendron, Christian Cibert, Louis Viollet, and Suzie Lefebvre. 2006. "Distinct Domains of the Spinal Muscular Atrophy Protein SMN Are Required for Targeting to Cajal Bodies in Mammalian Cells." *Journal of Cell Science* 119 (Pt 4): 680–92. <https://doi.org/10.1242/jcs.02782>.
- Renvoisé, Benoît, Gwendoline Quérol, Eloi Rémi Verrier, Philippe Burlet, and Suzie Lefebvre. 2012. "A Role for Protein Phosphatase PP1 $\gamma$  in SMN Complex Formation and Subnuclear Localization to Cajal Bodies." *Journal of Cell Science* 125 (Pt 12): 2862–74. <https://doi.org/10.1242/jcs.096255>.
- Ribes, Vanessa, Isabelle Le Roux, Muriel Rhinn, Brigitte Schuhbaur, and Pascal Dollé. 2009. "Early Mouse Caudal Development Relies on Crosstalk between Retinoic Acid, Shh and Fgf Signalling Pathways." *Development* 136 (4): 665–76. <https://doi.org/10.1242/dev.016204>.
- Riessland, Markus, Bastian Ackermann, Anja Förster, Miriam Jakubik, Jan Hauke, Lutz Garbes, Ina Fritzsche, et al. 2010. "SAHA Ameliorates the SMA Phenotype in Two Mouse Models for Spinal Muscular Atrophy." *Human Molecular Genetics* 19 (8): 1492–1506. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq023>.
- Riessland, Markus, Anna Kaczmarek, Svenja Schneider, Kathryn J. Swoboda, Heiko Löhr, Cathleen Bradler, Vanessa Grysko, et al. 2017. "Neurocalcin Delta Suppression Protects against Spinal Muscular Atrophy in Humans and across Species by Restoring Impaired Endocytosis." *American Journal of Human Genetics* 100 (2): 297–315. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.01.005>.
- Rigo, Frank, Yimin Hua, Adrian R. Krainer, and C. Frank Bennett. 2012. "Antisense-Based Therapy for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy." *The Journal of Cell Biology* 199 (1): 21–25. <https://doi.org/10.1083/jcb.201207087>.
- Rigoard, P., K. Buffenoir, S. Bauche, M. Fares, J. Koenig, D. Hantaï, J. -P. Giot, et al. 2009. "Modalités et outils d'observation de la jonction neuromusculaire." *Neurochirurgie*, « Jonction neuromusculaire et nerf périphérique : du normal au pathologique... Mise au point sur les données fondamentales et les avancées expérimentales », 55 (March): S43–48. <https://doi.org/10.1016/j.neuchi.2008.03.013>.
- Rihan, Khalil, Etienne Antoine, Thomas Maurin, Barbara Bardoni, Rémy Bordonné, Johann Soret, and Florence Rage. 2017. "A New Cis-Acting Motif Is Required for the Axonal SMN-Dependent Anxa2 mRNA Localization." *RNA* 23 (6): 899–909. <https://doi.org/10.1261/rna.056788.116>.
- Rindt, Hansjörg, Zhihua Feng, Chiara Mazzasette, Jacqueline J. Glascock, David Valdivia, Noah Pyles, Thomas O. Crawford, et al. 2015. "Astrocytes Influence the Severity of Spinal Muscular Atrophy." *Human Molecular Genetics* 24 (14): 4094–4102. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv148>.
- Ripolone, Michela, Dario Ronchi, Raffaella Violano, Dionis Vallejo, Gigliola Fagiolari, Emanuele Barca, Valeria Lucchini, et al. 2015. "Impaired Muscle Mitochondrial Biogenesis and Myogenesis in Spinal Muscular Atrophy." *JAMA Neurology* 72 (6): 666. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.0178>.
- Rivera, Teresa, Yuanyuan Zhao, Yuhui Ni, and Jiwu Wang. 2020. "Human-Induced Pluripotent Stem Cell Culture Methods Under CGMP Conditions." *Current Protocols in Stem Cell Biology* 54 (1): e117. <https://doi.org/10.1002/cpsc.117>.
- Rivière, J. 2007. "[Self-produced locomotion and spatial cognition: a new light from spinal muscular atrophy]." *Archives De Pédiatrie: Organe Officiel De La Société Française De Pédiatrie* 14 (3): 279–84. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2006.10.011>.
- Rizzo, Federica, Monica Nizzardo, Shikha Vashisht, Erika Molteni, Valentina Melzi, Michela Taiana, Sabrina Salani, et al. 2019. "Key Role of SMN/SYNERG1 and RNA-Motif 7 in Spinal Muscular Atrophy: RNA-Seq and Motif Analysis of Human Motor Neurons." *Brain* 142 (2): 276–94. <https://doi.org/10.1093/brain/awy330>.
- Robertson, W. C., Y. Kawamura, and P. J. Dyck. 1978. "Morphometric Study of Motoneurons in Congenital Nemaline Myopathy and Werdnig-Hoffmann Disease." *Neurology* 28 (10): 1057–61. <https://doi.org/10.1212/wnl.28.10.1057>.
- Rochette, C. F., N. Gilbert, and L. R. Simard. 2001. "SMN Gene Duplication and the Emergence of the SMN2 Gene Occurred in Distinct Hominids: SMN2 Is Unique to Homo Sapiens." *Human Genetics* 108 (3): 255–66.

- <https://doi.org/10.1007/s004390100473>.
- Rochette, C.F., L.C. Surh, P.N. Ray, P.E. McAndrew, T.W. Prior, A.H.M. Burghes, M. Vanasse, and L.R. Simard. 1997. "Molecular Diagnosis of Non-Deletion SMA Patients Using Quantitative PCR of SMN Exon 7." *Neurogenetics* 1 (2): 141–47. <https://doi.org/10.1007/s100480050021>.
- Rodrigues, N. R., N. Owen, K. Talbot, J. Ignatius, V. Dubowitz, and K. E. Davies. 1995. "Deletions in the Survival Motor Neuron Gene on 5q13 in Autosomal Recessive Spinal Muscular Atrophy." *Human Molecular Genetics* 4 (4): 631–34. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.4.631>.
- Rodríguez Cruz, Pedro M., Jacqueline Palace, and David Beeson. 2018. "The Neuromuscular Junction and Wide Heterogeneity of Congenital Myasthenic Syndromes." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (6): E1677. <https://doi.org/10.3390/ijms19061677>.
- Rodriguez-Muela, Natalia, Nadia K. Litterman, Erika M. Norabuena, Jesse L. Mull, Maria José Galazo, Chicheng Sun, Shi-Yan Ng, et al. 2017. "Single-Cell Analysis of SMN Reveals Its Broader Role in Neuromuscular Disease." *Cell Reports* 18 (6): 1484–98. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.035>.
- Rodriguez-Muela, Natalia, Andrey Parkhitko, Tobias Grass, Rebecca M. Gibbs, Erika M. Norabuena, Norbert Perrimon, Rajat Singh, and Lee L. Rubin. 2018. "Blocking P62-Dependent SMN Degradation Ameliorates Spinal Muscular Atrophy Disease Phenotypes." *Journal of Clinical Investigation* 128 (7): 3008–23. <https://doi.org/10.1172/JCI95231>.
- Roelink, H., J. A. Porter, C. Chiang, Y. Tanabe, D. T. Chang, P. A. Beachy, and T. M. Jessell. 1995. "Floor Plate and Motor Neuron Induction by Different Concentrations of the Amino-Terminal Cleavage Product of Sonic Hedgehog Autoproteolysis." *Cell* 81 (3): 445–55. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90397-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90397-6).
- Rogers, Robert S., and Hiroshi Nishimune. 2017. "The Role of Laminins in the Organization and Function of Neuromuscular Junctions." *Matrix Biology, Basement Membranes in Health and Disease*, 57–58 (January): 86–105. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.08.008>.
- Roghani, A., J. Feldman, S. A. Kohan, A. Shirzadi, C. B. Gundersen, N. Brecha, and R. H. Edwards. 1994. "Molecular Cloning of a Putative Vesicular Transporter for Acetylcholine." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (22): 10620–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.22.10620>.
- Roy, N., M. S. Mahadevan, M. McLean, G. Shutler, Z. Yaraghi, R. Farahani, S. Baird, A. Besner-Johnston, C. Lefebvre, and X. Kang. 1995. "The Gene for Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein Is Partially Deleted in Individuals with Spinal Muscular Atrophy." *Cell* 80 (1): 167–78. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90461-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90461-1).
- Rubin, Lee L. 2008. "Stem Cells and Drug Discovery: The Beginning of a New Era?" *Cell* 132 (4): 549–52. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.010>.
- Rudnik-Schöneborn, S., H. H. Goebel, W. Schlote, S. Molaian, H. Omran, U. Ketelsen, R. Korinthenberg, et al. 2003. "Classical Infantile Spinal Muscular Atrophy with SMN Deficiency Causes Sensory Neuronopathy." *Neurology* 60 (6): 983–87. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000052788.39340.45>.
- Rudnik-Schöneborn, S., R. Heller, C. Berg, C. Betzler, T. Grimm, T. Eggermann, K. Eggermann, R. Wirth, B. Wirth, and K. Zerres. 2008. "Congenital Heart Disease Is a Feature of Severe Infantile Spinal Muscular Atrophy." *Journal of Medical Genetics* 45 (10): 635–38. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.057950>.
- Rudnik-Schöneborn, Sabine, Silke Vogelgesang, Sven Armbrust, Luitgard Graul-Neumann, Christoph Fusch, and Klaus Zerres. 2010. "Digital Necroses and Vascular Thrombosis in Severe Spinal Muscular Atrophy." *Muscle & Nerve* 42 (1): 144–47. <https://doi.org/10.1002/mus.21654>.
- Ruggiu, Matteo, Vicki L. McGovern, Francesco Lotti, Luciano Saieva, Darrick K. Li, Shingo Kariya, Umrao R. Monani, Arthur H. M. Burghes, and Livio Pellizzoni. 2012. "A Role for SMN Exon 7 Splicing in the Selective Vulnerability of Motor Neurons in Spinal Muscular Atrophy." *Molecular and Cellular Biology* 32 (1): 126–38. <https://doi.org/10.1128/MCB.06077-11>.
- Ruhno, Corey, Vicki L. McGovern, Matthew R. Avenarius, Pamela J. Snyder, Thomas W. Prior, Flavia C. Nery, Abdurrahman Muhtaseb, et al. 2019. "Complete Sequencing of the SMN2 Gene in SMA Patients Detects SMN Gene Deletion Junctions and Variants in SMN2 That Modify the SMA Phenotype." *Human Genetics* 138 (3): 241–56. <https://doi.org/10.1007/s00439-019-01983-0>.
- Ruillier, Valentin, Johana Tournois, Claire Boissart, Marie Lasbareilles, Gurvan Mahé, Laure Chatrousse, Michel Cailleret, Marc Peschanski, and Alexandra Benchoua. 2020. "Rescuing Compounds for Lesch-Nyhan Disease Identified Using Stem Cell-Based Phenotypic Screening." *JCI Insight* 5 (4): 132094. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.132094>.
- Ruiz, Jonatan R., Francisco B. Ortega, Ruth Castillo, Miguel Martín-Matillas, Lydia Kwak, German Vicente-Rodríguez, Jose Noriega, et al. 2010. "Physical Activity, Fitness, Weight Status, and Cognitive Performance in Adolescents." *The Journal of Pediatrics* 157 (6): 917-922.e1-5. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2010.06.026>.

- Ruiz, Rocío, Juan José Casañas, Laura Torres-Benito, Raquel Cano, and Lucía Tabares. 2010. "Altered Intracellular Ca<sup>2+</sup> Homeostasis in Nerve Terminals of Severe Spinal Muscular Atrophy Mice." *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30 (3): 849–57. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4496-09.2010>.
- Ruiz, Rocío, and Lucía Tabares. 2014. "Neurotransmitter Release in Motor Nerve Terminals of a Mouse Model of Mild Spinal Muscular Atrophy." *Journal of Anatomy* 224 (1): 74–84. <https://doi.org/10.1111/joa.12038>.
- Russman, Barry S. 2007. "Spinal Muscular Atrophy: Clinical Classification and Disease Heterogeneity." *Journal of Child Neurology* 22 (8): 946–51. <https://doi.org/10.1177/0883073807305673>.
- Sabapathy, Kanaga. 2012. "Role of the JNK Pathway in Human Diseases." *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 106: 145–69. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396456-4.00013-4>.
- Sabra, Mirna, Pascale Texier, Jhony El Maalouf, and Patrick Lomonte. 2013. "The Tudor Protein Survival Motor Neuron (SMN) Is a Chromatin-Binding Protein That Interacts with Methylated Lysine 79 of Histone H3." *Journal of Cell Science* 126 (Pt 16): 3664–77. <https://doi.org/10.1242/jcs.126003>.
- Sakurai, Hidetoshi, Yasuko Sakaguchi, Emi Shoji, Tokiko Nishino, Izumi Maki, Hiroshi Sakai, Kazunori Hanaoka, Akira Kakizuka, and Atsuko Sehara-Fujisawa. 2012. "In Vitro Modeling of Paraxial Mesodermal Progenitors Derived from Induced Pluripotent Stem Cells." *PLOS ONE* 7 (10): e47078. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047078>.
- Salpeter, M. M., and R. H. Loring. 1985. "Nicotinic Acetylcholine Receptors in Vertebrate Muscle: Properties, Distribution and Neural Control." *Progress in Neurobiology* 25 (4): 297–325. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(85\)90018-8](https://doi.org/10.1016/0301-0082(85)90018-8).
- Sances, S, Li Bruijn, S Chandran, K Eggan, R Ho, J Klim, MR Livesey, et al. 2016. "Modeling ALS Using Motor Neurons Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells." *Nature Neuroscience* 19 (4): 542–53. <https://doi.org/10.1038/nn.4273>.
- Sanchez, Gabriel, Emma Bondy-Chorney, Janik Laframboise, Geneviève Paris, Andréanne Didillon, Bernard J. Jasmin, and Jocelyn Côté. 2016. "A Novel Role for CARM1 in Promoting Nonsense-Mediated mRNA Decay: Potential Implications for Spinal Muscular Atrophy." *Nucleic Acids Research* 44 (6): 2661–76. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1334>.
- Sanchez, Gabriel, Alain Y. Dury, Lyndsay M. Murray, Olivier Biondi, Helina Tadesse, Rachid El Fatimy, Rashmi Kothary, Frédéric Charbonnier, Edouard W. Khandjian, and Jocelyn Côté. 2013. "A Novel Function for the Survival Motoneuron Protein as a Translational Regulator." *Human Molecular Genetics* 22 (4): 668–84. <https://doi.org/10.1093/hmg/dd5474>.
- Sansa, Alba, Sandra de la Fuente, Joan X. Comella, Ana Garcera, and Rosa M. Soler. 2021. "Intracellular Pathways Involved in Cell Survival Are Deregulated in Mouse and Human Spinal Muscular Atrophy Motoneurons." *Neurobiology of Disease* 155 (July): 105366. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105366>.
- Santhanam, Navaneetha, Lee Kumanchik, Xiufang Guo, Frank Sommerhage, Yunqing Cai, Max Jackson, Candace Martin, et al. 2018. "Stem Cell Derived Phenotypic Human Neuromuscular Junction Model for Dose Response Evaluation of Therapeutics." *Biomaterials* 166 (June): 64–78. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.02.047>.
- Santoso, Jeffrey W., and Megan L. McCain. 2020. "Neuromuscular Disease Modeling on a Chip." *Disease Models & Mechanisms* 13 (7): dmm044867. <https://doi.org/10.1242/dmm.044867>.
- Sapaly, Delphine, Matthieu Dos Santos, Perrine Delers, Olivier Biondi, Gwendoline Quérol, Léo Houdebine, Kevinee Khoobarry, et al. 2018. "Small-Molecule Flunarizine Increases SMN Protein in Nuclear Cajal Bodies and Motor Function in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy." *Scientific Reports* 8 (1): 2075. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20219-1>.
- Sareen, Dhruv, Allison D. Ebert, Brittany M. Heins, Jered V. McGivern, Loren Ornelas, and Clive N. Svendsen. 2012. "Inhibition of Apoptosis Blocks Human Motor Neuron Cell Death in a Stem Cell Model of Spinal Muscular Atrophy." *PLoS One* 7 (6): e39113. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039113>.
- Sarnat, Harvey B., and Cynthia L. Trevenen. 2007. "Motor Neuron Degeneration in a 20-Week Male Fetus: Spinal Muscular Atrophy Type 0." *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques* 34 (2): 215–20. <https://doi.org/10.1017/s0317167100006077>.
- Scharf, Jeremiah, M. Endrizzi, Axel Wetter, Sidong Huang, Terri Thompson, Klaus Zerres, William Dietrich, Brunhilde Wirth, and Louis Kunkel. 1998. "Identification of a Candidate Modifying Gene for Spinal Muscular Atrophy by Comparative Genomics." *Nature Genetics* 20 (October): 83–86. <https://doi.org/10.1038/1753>.
- Schellino, Roberta, Marina Boido, Tiziana Borsello, and Alessandro Vercelli. 2018. "Pharmacological C-Jun NH2-Terminal Kinase (JNK) Pathway Inhibition Reduces Severity of Spinal Muscular Atrophy Disease in Mice." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11 (September): 308. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00308>.

- Schellino, Roberta, Marina Boido, and Alessandro Vercelli. 2019. "JNK Signaling Pathway Involvement in Spinal Cord Neuron Development and Death." *Cells* 8 (12): 1576. <https://doi.org/10.3390/cells8121576>.
- Schmid, Aloicia, and Christine J. DiDonato. 2007. "Animal Models of Spinal Muscular Atrophy." *Journal of Child Neurology* 22 (8): 1004–12. <https://doi.org/10.1177/0883073807305667>.
- Schorling, David C., Astrid Pechmann, and Janbernd Kirschner. 2020. "Advances in Treatment of Spinal Muscular Atrophy - New Phenotypes, New Challenges, New Implications for Care." *Journal of Neuromuscular Diseases* 7 (1): 1–13. <https://doi.org/10.3233/JND-190424>.
- Schrank, B., R. Götz, J. M. Gunnensen, J. M. Ure, K. V. Toyka, A. G. Smith, and M. Sendtner. 1997. "Inactivation of the Survival Motor Neuron Gene, a Candidate Gene for Human Spinal Muscular Atrophy, Leads to Massive Cell Death in Early Mouse Embryos." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (18): 9920–25. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.18.9920>.
- Schreml, Julia, Markus Riessland, Mario Paterno, Lutz Garbes, Kristina Roßbach, Bastian Ackermann, Jan Krämer, et al. 2013. "Severe SMA Mice Show Organ Impairment That Cannot Be Rescued by Therapy with the HDACi JNJ-26481585." *European Journal of Human Genetics: EJHG* 21 (6): 643–52. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.222>.
- Scoto, M., R. S. Finkel, E. Mercuri, and F. Muntoni. 2017. "Therapeutic Approaches for Spinal Muscular Atrophy (SMA)." *Gene Therapy* 24 (9): 514–19. <https://doi.org/10.1038/gt.2017.45>.
- Selenko, Philipp, Remco Sprangers, Gunter Stier, Dirk Bühler, Utz Fischer, and Michael Sattler. 2001. "SMN Tudor Domain Structure and Its Interaction with the Sm Proteins." *Nature Structural Biology* 8 (1): 5.
- Semmler, Alexander, Torsten Okulla, Magdalena Sastre, Lucia Dumitrescu-Ozimek, and Michael T. Heneka. 2005. "Systemic Inflammation Induces Apoptosis with Variable Vulnerability of Different Brain Regions." *Journal of Chemical Neuroanatomy* 30 (2–3): 144–57. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2005.07.003>.
- Sen, Anindya, Takakazu Yokokura, Mark W. Kankel, Douglas N. Dimlich, Jan Manent, Subhabrata Sanyal, and Spyros Artavanis-Tsakonas. 2011. "Modeling Spinal Muscular Atrophy in Drosophila Links Smn to FGF Signaling." *The Journal of Cell Biology* 192 (3): 481–95. <https://doi.org/10.1083/jcb.201004016>.
- Servais, Laurent, Giovanni Baranello, Mariacristina Scoto, Aurore Daron, and Maryam Oskoui. 2021. "Therapeutic Interventions for Spinal Muscular Atrophy: Preclinical and Early Clinical Development Opportunities." *Expert Opinion on Investigational Drugs* 30 (5): 519–27. <https://doi.org/10.1080/13543784.2021.1904889>.
- Shababi, M., C. L. Lorson, and S. S. Rudnik-Schoneborn. 2014. "Spinal Muscular Atrophy: A Motor Neuron Disorder or a Multi-Organ Disease?" *J Anat* 224 (1): 15–28. <https://doi.org/10.1111/joa.12083>.
- Shababi, Monir, Javad Habibi, Hsiao T. Yang, Spencer M. Vale, Will A. Sewell, and Christian L. Lorson. 2010. "Cardiac Defects Contribute to the Pathology of Spinal Muscular Atrophy Models." *Human Molecular Genetics* 19 (20): 4059–71. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq329>.
- Shah, Pranjul, Joëlle V. Fritz, Enrico Glaab, Mahesh S. Desai, Kacy Greenhalgh, Audrey Frachet, Magdalena Niegowska, et al. 2016. "A Microfluidics-Based in Vitro Model of the Gastrointestinal Human–Microbe Interface." *Nature Communications* 7 (1): 11535. <https://doi.org/10.1038/ncomms11535>.
- Shanmugarajan, Srinivasan, Kathryn J. Swoboda, Susan T. Iannaccone, William L. Ries, Bernard L. Maria, and Sakamuri V. Reddy. 2007. "Congenital Bone Fractures in Spinal Muscular Atrophy: Functional Role for SMN Protein in Bone Remodeling." *Journal of Child Neurology* 22 (8): 967–73. <https://doi.org/10.1177/0883073807305664>.
- Shanmugarajan, Srinivasan, Eichi Tsuruga, Kathryn J. Swoboda, Bernard L. Maria, William L. Ries, and Sakamuri V. Reddy. 2009. "Bone Loss in Survival Motor Neuron (Smn(-/-) SMN2) Genetic Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy." *The Journal of Pathology* 219 (1): 52–60. <https://doi.org/10.1002/path.2566>.
- Sharma, Aarti, Anja Lambrechts, Le Thi Hao, Thanh T. Le, Caroline A. Sewry, Christophe Ampe, Arthur H. M. Burghes, and Glenn E. Morris. 2005. "A Role for Complexes of Survival of Motor Neurons (SMN) Protein with Gemins and Profilin in Neurite-like Cytoplasmic Extensions of Cultured Nerve Cells." *Experimental Cell Research* 309 (1): 185–97. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2005.05.014>.
- Sharma, Arun, Samuel Sances, Michael J. Workman, and Clive N. Svendsen. 2020. "Multi-Lineage Human iPSC-Derived Platforms for Disease Modeling and Drug Discovery." *Cell Stem Cell* 26 (3): 309–29. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.02.011>.
- Shen, Chengyong, Lei Li, Kai Zhao, Lei Bai, Ailian Wang, Xiaoqiu Shu, Yatao Xiao, et al. 2018. "Motoneuron Wnts Regulate Neuromuscular Junction Development." *ELife* 7 (August): e34625. <https://doi.org/10.7554/eLife.34625>.
- Shimojo, Daisuke, Kazunari Onodera, Yukiko Doi-Torii, Yasuharu Ishihara, Chinatsu Hattori, Yukino Miwa, Satoshi Tanaka, et al. 2015. "Rapid, Efficient, and Simple Motor Neuron Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells." *Molecular Brain* 8 (1): 79. <https://doi.org/10.1186/s13041-015-0172-4>.

- Shishikura, K., M. Hara, Y. Sasaki, and K. Misugi. 1983. "A Neuropathologic Study of Werdnig-Hoffmann Disease with Special Reference to the Thalamus and Posterior Roots." *Acta Neuropathologica* 60 (1–2): 99–106. <https://doi.org/10.1007/BF00685353>.
- Shorrock, Hannah K, Dinja van der Hoorn, Penelope J Boyd, Maica Llaverro Hurtado, Douglas J Lamont, Brunhilde Wirth, James N Sleigh, et al. 2018. "UBA1/GARS-Dependent Pathways Drive Sensory-Motor Connectivity Defects in Spinal Muscular Atrophy." *Brain* 141 (10): 2878–94. <https://doi.org/10.1093/brain/awy237>.
- Shu, Cynthia, Liubov Parfenova, Ekaterina Mokhonova, Judd R. Collado, Robert Damoiseaux, Jesus Campagna, Varghese John, and Rachelle H. Crosbie. 2020. "High-Throughput Screening Identifies Modulators of Sarcospan That Stabilize Muscle Cells and Exhibit Activity in the Mouse Model of Duchenne Muscular Dystrophy." *Skeletal Muscle* 10 (1): 26. <https://doi.org/10.1186/s13395-020-00244-3>.
- Sigoillot, Séverine M., Francine Bourgeois, Jennifer Karmouch, Jordi Molgó, Alexandre Dobbertin, Catherine Chevalier, Rémi Houlgatte, Jean Léger, and Claire Legay. 2016. "Neuromuscular Junction Immaturity and Muscle Atrophy Are Hallmarks of the ColQ-Deficient Mouse, a Model of Congenital Myasthenic Syndrome with Acetylcholinesterase Deficiency." *The FASEB Journal* 30 (6): 2382–99. <https://doi.org/10.1096/fj.201500162>.
- Simic, Goran, Durdica Seso-Simic, Paul J. Lucassen, Atiqul Islam, Zeljka Krsnik, Aida Cviko, Drazen Jelasic, et al. 2000. "Ultrastructural Analysis and TUNEL Demonstrate Motor Neuron Apoptosis in Werdnig-Hoffmann Disease." *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 59 (5): 398–407. <https://doi.org/10.1093/jnen/59.5.398>.
- Simon, Christian M., Ya Dai, Meaghan Van Alstyne, Charalampia Koutsoumpa, John G. Pagiazitis, Joshua I. Chalif, Xiaojian Wang, et al. 2017. "Converging Mechanisms of P53 Activation Drive Motor Neuron Degeneration in Spinal Muscular Atrophy." *Cell Reports* 21 (13): 3767–80. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.003>.
- Simon, Christian M., Meaghan Van Alstyne, Francesco Lotti, Elena Bianchetti, Sarah Tisdale, D. Martin Watterson, George Z. Mentis, and Livio Pellizzoni. 2019. "Stasimon Contributes to the Loss of Sensory Synapses and Motor Neuron Death in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy." *Cell Reports* 29 (12): 3885–3901.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.058>.
- Singh, Natalia N., Shaine Hoffman, Prabhakara P. Reddi, and Ravindra N. Singh. 2021. "Spinal Muscular Atrophy: Broad Disease Spectrum and Sex-Specific Phenotypes." *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease* 1867 (4): 166063. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.166063>.
- Singh, Natalia N., Brian M. Lee, Christine J. DiDonato, and Ravindra N. Singh. 2015. "Mechanistic Principles of Antisense Targets for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy." *Future Medicinal Chemistry* 7 (13): 1793–1808. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.101>.
- Singh, Natalia N., Joonbae Seo, Eric W. Ottesen, Maria Shishimorova, Dhruva Bhattacharya, and Ravindra N. Singh. 2011. "TIA1 Prevents Skipping of a Critical Exon Associated with Spinal Muscular Atrophy." *Molecular and Cellular Biology* 31 (5): 935–54. <https://doi.org/10.1128/MCB.00945-10>.
- Singh, Natalia N., Joonbae Seo, Sarah J. Rahn, and Ravindra N. Singh. 2012. "A Multi-Exon-Skipping Detection Assay Reveals Surprising Diversity of Splice Isoforms of Spinal Muscular Atrophy Genes." *PloS One* 7 (11): e49595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049595>.
- Singh, Natalia N., Ravindra N. Singh, and Elliot J. Androphy. 2007. "Modulating Role of RNA Structure in Alternative Splicing of a Critical Exon in the Spinal Muscular Atrophy Genes." *Nucleic Acids Research* 35 (2): 371–89. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl1050>.
- Singh, Nirmal K., Natalia N. Singh, Elliot J. Androphy, and Ravindra N. Singh. 2006. "Splicing of a Critical Exon of Human Survival Motor Neuron Is Regulated by a Unique Silencer Element Located in the Last Intron." *Molecular and Cellular Biology* 26 (4): 1333–46. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.4.1333-1346.2006>.
- Singh, Ravindra N., Matthew D. Howell, Eric W. Ottesen, and Natalia N. Singh. 2017. "Diverse Role of Survival Motor Neuron Protein." *Biochimica et Biophysica Acta* 1860 (3): 299–315. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2016.12.008>.
- Singh, Ravindra N., Eric W. Ottesen, and Natalia N. Singh. 2020. "The First Orally Deliverable Small Molecule for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy." *Neuroscience Insights* 15 (January): 263310552097398. <https://doi.org/10.1177/2633105520973985>.
- Sison, Samantha L., Teresa N. Patitucci, Emily R. Seminary, Eric Villalon, Christian L. Lorson, and Allison D. Ebert. 2017. "Astrocyte-Produced MiR-146a as a Mediator of Motor Neuron Loss in Spinal Muscular Atrophy." *Human Molecular Genetics* 26 (17): 3409–20. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx230>.
- Skoglund, Gunnar, Jeanne Lainé, Radbod Darabi, Emmanuel Fournier, Rita Perlingeiro, and Nacira Tabti. 2014. "Physiological and Ultrastructural Features of Human Induced Pluripotent and Embryonic Stem Cell-Derived Skeletal Myocytes in Vitro." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America* 111 (22): 8275–80. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322258111>.
- Skordis, Leigh A., Matthew G. Dunckley, Baigong Yue, Ian C. Eperon, and Francesco Muntoni. 2003. “Bifunctional Antisense Oligonucleotides Provide a Trans-Acting Splicing Enhancer That Stimulates SMN2 Gene Expression in Patient Fibroblasts.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (7): 4114–19. <https://doi.org/10.1073/pnas.0633863100>.
- Slater, Clarke R. 2015. “The Functional Organization of Motor Nerve Terminals.” *Progress in Neurobiology* 134 (November): 55–103. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.09.004>.
- Slater, Clarke R. 2017. “The Structure of Human Neuromuscular Junctions: Some Unanswered Molecular Questions.” *International Journal of Molecular Sciences* 18 (10): 2183. <https://doi.org/10.3390/ijms18102183>.
- Sleigh, James N., Thomas H. Gillingwater, and Kevin Talbot. 2011. “The Contribution of Mouse Models to Understanding the Pathogenesis of Spinal Muscular Atrophy.” *Disease Models & Mechanisms* 4 (4): 457–67. <https://doi.org/10.1242/dmm.007245>.
- Sobel, A., T. Heidmann, J. Hofler, and J. P. Changeux. 1978. “Distinct Protein Components from Torpedo Marmorata Membranes Carry the Acetylcholine Receptor Site and the Binding Site for Local Anesthetics and Histriocotoxin.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75 (1): 510–14. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.1.510>.
- Soler-Botija, Caroline, Isidre Ferrer, Ignasi Gich, Montserrat Baiget, and Eduardo F. Tizzano. 2002. “Neuronal Death Is Enhanced and Begins during Foetal Development in Type I Spinal Muscular Atrophy Spinal Cord.” *Brain: A Journal of Neurology* 125 (Pt 7): 1624–34. <https://doi.org/10.1093/brain/awf155>.
- Solier, Stéphanie, Amélie Lansiaux, Emmanuelle Logette, Jane Wu, Johann Soret, Jamal Tazi, Christian Bailly, Lydie Desoche, Eric Solary, and Laurent Corcos. 2004. “Topoisomerase I and II Inhibitors Control Caspase-2 Pre-Messenger RNA Splicing in Human Cells.” *Molecular Cancer Research: MCR* 2 (1): 53–61.
- Somers, E., Z. Stencel, T. M. Wishart, T. H. Gillingwater, and S. H. Parson. 2012. “Density, Calibre and Ramification of Muscle Capillaries Are Altered in a Mouse Model of Severe Spinal Muscular Atrophy.” *Neuromuscular Disorders: NMD* 22 (5): 435–42. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2011.10.021>.
- Son, Ye Seul, Kwangman Choi, Hana Lee, Ohman Kwon, Kwang Bo Jung, Sunwha Cho, Jiyeon Baek, et al. 2019. “A SMN2 Splicing Modifier Rescues the Disease Phenotypes in an In Vitro Human Spinal Muscular Atrophy Model.” *Stem Cells and Development* 28 (7): 438–53. <https://doi.org/10.1089/scd.2018.0181>.
- Song, Joo Young, Hyun Su Kim, Se-Jun Park, Jiwon Lee, and Jeehun Lee. 2020. “Nusinersen Administration in Spinal Muscular Atrophy Patients with Severe Scoliosis: Interlaminar Approaches at the Lumbar Level.” *Annals of Child Neurology* 28 (2): 49–56. <https://doi.org/10.26815/acn.2020.00045>.
- Souček, Přemysl, Kamila Réblová, Michal Kramárek, Lenka Radová, Tereza Grymová, Pavla Hujová, Tatiana Kováčová, Matej Lexa, Lucie Grodecká, and Tomáš Freiberger. 2019. “High-Throughput Analysis Revealed Mutations’ Diverging Effects on SMN1 Exon 7 Splicing.” *RNA Biology* 16 (10): 1364–76. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1630796>.
- Spring, Ashlyn M., Amanda C. Raimer, Christine D. Hamilton, Michela J. Schillinger, and A. Gregory Matera. 2019. “Comprehensive Modeling of Spinal Muscular Atrophy in *Drosophila Melanogaster*.” *Frontiers in Molecular Neuroscience* 12 (May): 113. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00113>.
- Sridharan, Rupa, Jason Tchieu, Mike J. Mason, Robin Yachechko, Edward Kuoy, Steve Horvath, Qing Zhou, and Kathrin Plath. 2009. “Role of the Murine Reprogramming Factors in the Induction of Pluripotency.” *Cell* 136 (2): 364–77. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.001>.
- Stabley, Deborah L., Ashlee W. Harris, Jennifer Holbrook, Nicholas J. Chubbs, Kevin W. Lozo, Thomas O. Crawford, Kathryn J. Swoboda, et al. 2015. “SMN1 and SMN2 Copy Numbers in Cell Lines Derived from Patients with Spinal Muscular Atrophy as Measured by Array Digital PCR.” *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 3 (4): 248–57. <https://doi.org/10.1002/mgg3.141>.
- Stabley, Deborah L., Jennifer Holbrook, Mena Scavina, Thomas O. Crawford, Kathryn J. Swoboda, Katherine M. Robbins, and Matthew E. R. Butchbach. 2021. “Detection of SMN1 to SMN2 Gene Conversion Events and Partial SMN1 Gene Deletions Using Array Digital PCR.” *Neurogenetics* 22 (1): 53–64. <https://doi.org/10.1007/s10048-020-00630-5>.
- Staerk, Judith, Meelad M. Dawlaty, Qing Gao, Dorothea Maetzel, Jacob Hanna, Cesar A. Sommer, Gustavo Mostoslavsky, and Rudolf Jaenisch. 2010. “Reprogramming of Human Peripheral Blood Cells to Induced Pluripotent Stem Cells.” *Cell Stem Cell* 7 (1): 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.002>.
- Stam, Marloes, Renske I. Wadman, Bart Bartels, Maureen Leeuw, Henk-Jan Westeneng, Camiel A. Wijngaarde, Leonard H. van den Berg, and W. Ludo van der Pol. 2018. “A Continuous Repetitive Task to Detect Fatigability in Spinal Muscular Atrophy.” *Orphanet Journal of Rare Diseases* 13 (1): 160. <https://doi.org/10.1186/s13023-018-0904-5>.

- Staropoli, John F., Huo Li, Seung J. Chun, Norm Allaire, Patrick Cullen, Alice Thai, Christina M. Fleet, et al. 2015. "Rescue of Gene-Expression Changes in an Induced Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy by an Antisense Oligonucleotide That Promotes Inclusion of SMN2 Exon 7." *Genomics* 105 (4): 220–28. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.01.007>.
- Steege, G. van der, P. M. Grootsholten, J. M. Cobben, S. Zappata, H. Scheffer, J. T. den Dunnen, G. J. van Ommen, C. Brahe, and C. H. Buys. 1996. "Apparent Gene Conversions Involving the SMN Gene in the Region of the Spinal Muscular Atrophy Locus on Chromosome 5." *American Journal of Human Genetics* 59 (4): 834–38. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1914786/>.
- Steege, Gerrit van der, Tineke G. Draaijers, Petra M. Grootsholten, Jan Osinga, Rosanna Anzevino, Isabella Velonà, Johan T. Den Dunnen, et al. 1995. "A Provisional Transcript Map of the Spinal Muscular Atrophy (SMA) Critical Region." *European Journal of Human Genetics* 3 (2): 87–95. <https://doi.org/10.1159/000472281>.
- Steichen, Clara, Zara Hannoun, Eléanor Luce, Thierry Hauet, and Anne Dubart-Kupperschmitt. 2019. "Genomic Integrity of Human Induced Pluripotent Stem Cells: Reprogramming, Differentiation and Applications." *World Journal of Stem Cells* 11 (10): 729–47. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i10.729>.
- Steinbeck, Julius A., Manoj K. Jaiswal, Elizabeth L. Calder, Sarah Kishinevsky, Andreas Weishaupt, Klaus V. Toyka, Peter A. Goldstein, and Lorenz Studer. 2016. "Functional Connectivity under Optogenetic Control Allows Modeling of Human Neuromuscular Disease." *Cell Stem Cell* 18 (1): 134–43. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.10.002>.
- Steiner, Debora, Hanita Khaner, Malkiel Cohen, Sharon Even-Ram, Yaniv Gil, Pavel Itsykson, Tikva Turetsky, et al. 2010. "Derivation, Propagation and Controlled Differentiation of Human Embryonic Stem Cells in Suspension." *Nature Biotechnology* 28 (4): 361–64. <https://doi.org/10.1038/nbt.1616>.
- Stevens, L., B. Bastide, C. A. Maurage, E. Dupont, V. Montel, C. Cieniewski-Bernard, J. M. Cuisset, L. Vallée, and Y. Mounier. 2008. "Childhood Spinal Muscular Atrophy Induces Alterations in Contractile and Regulatory Protein Isoform Expressions." *Neuropathology and Applied Neurobiology* 34 (6): 659–70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2008.00950.x>.
- Strochlic, Laure, Julien Falk, Evelyne Goillot, Séverine Sigoillot, Francine Bourgeois, Perrine Delers, Jérôme Rouvière, et al. 2012. "Wnt4 Participates in the Formation of Vertebrate Neuromuscular Junction." *PLOS ONE* 7 (1): e29976. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029976>.
- Südhof, Thomas C. 2012. "The Presynaptic Active Zone." *Neuron* 75 (1): 11–25. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.012>.
- Sugarman, Elaine A., Narasimhan Nagan, Hui Zhu, Viatcheslav R. Akmaev, Zhaoqing Zhou, Elizabeth M. Rohlfs, Kerry Flynn, et al. 2012. "Pan-Ethnic Carrier Screening and Prenatal Diagnosis for Spinal Muscular Atrophy: Clinical Laboratory Analysis of >72,400 Specimens." *European Journal of Human Genetics: EJHG* 20 (1): 27–32. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.134>.
- Sumner, Charlotte J., and Thomas O. Crawford. 2018. "Two Breakthrough Gene-Targeted Treatments for Spinal Muscular Atrophy: Challenges Remain." *The Journal of Clinical Investigation* 128 (8): 3219–27. <https://doi.org/10.1172/JCI121658>.
- Suzuki, Akiko, Anne Scruggs, and Junichi Iwata. 2015. "The Temporal Specific Role of WNT/ $\beta$ -Catenin Signaling during Myogenesis." *Journal of Nature and Science* 1 (8): e143.
- Swoboda, Kathryn J., Thomas W. Prior, Charles B. Scott, Teresa P. McNaught, Mark C. Wride, Sandra P. Reyna, and Mark B. Bromberg. 2005. "Natural History of Denervation in SMA: Relation to Age, SMN2 Copy Number, and Function." *Annals of Neurology* 57 (5): 704–12. <https://doi.org/10.1002/ana.20473>.
- Szunyogova, Eva, Haiyan Zhou, Gillian K. Maxwell, Rachael A. Powis, Francesco Muntoni, Thomas H. Gillingwater, and Simon H. Parson. 2016. "Survival Motor Neuron (SMN) Protein Is Required for Normal Mouse Liver Development." *Scientific Reports* 6 (October): 34635. <https://doi.org/10.1038/srep34635>.
- Tada, M., Y. Takahama, K. Abe, N. Nakatsuji, and T. Tada. 2001. "Nuclear Reprogramming of Somatic Cells by in Vitro Hybridization with ES Cells." *Current Biology: CB* 11 (19): 1553–58. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00459-6](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00459-6).
- Tadesse, Helina, Julie Deschênes-Furry, Sophie Boisvenue, and Jocelyn Côté. 2008. "KH-Type Splicing Regulatory Protein Interacts with Survival Motor Neuron Protein and Is Misregulated in Spinal Muscular Atrophy." *Human Molecular Genetics* 17 (4): 506–24. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm327>.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2016. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 183–193. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.8>

- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takahashi, M., Kubo, T., Mizoguchi, A., Carlson, C.G., Endo, K., Ohnishi, K., 2002. Spontaneous muscle action potentials fail to develop without fetal-type acetylcholine receptors. *EMBO Rep* 3, 674–681. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf128>
- Takebe, Takanori, Keisuke Sekine, Masahiro Enomura, Hiroyuki Koike, Masaki Kimura, Takunori Ogaeri, Ran-Ran Zhang, et al. 2013. “Vascularized and Functional Human Liver from an iPSC-Derived Organ Bud Transplant.” *Nature* 499 (7459): 481–84. <https://doi.org/10.1038/nature12271>.
- Takebe, Takanori, Boyang Zhang, and Milica Radisic. 2017. “Synergistic Engineering: Organoids Meet Organs-on-a-Chip.” *Cell Stem Cell* 21 (3): 297–300. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.08.016>.
- Tannenbaum, Shelly E., Tikva Tako Turetsky, Orna Singer, Einat Aizenman, Sophie Kirshberg, Nili Ilouz, Yaniv Gil, et al. 2012. “Derivation of Xeno-Free and GMP-Grade Human Embryonic Stem Cells--Platforms for Future Clinical Applications.” *PloS One* 7 (6): e35325. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035325>.
- Tao, Yunlong, and Su-Chun Zhang. 2016. “Neural Subtype Specification from Human Pluripotent Stem Cells.” *Cell Stem Cell* 19 (5): 573–86. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.10.015>.
- Tapia, Olga, Rocío Bengoechea, Ana Palanca, Rosa Arteaga, J. Fernando Val-Bernal, Eduardo F. Tizzano, María T. Berciano, and Miguel Lafarga. 2012. “Reorganization of Cajal Bodies and Nucleolar Targeting of Coilin in Motor Neurons of Type I Spinal Muscular Atrophy.” *Histochemistry and Cell Biology* 137 (5): 657–67. <https://doi.org/10.1007/s00418-012-0921-8>.
- Tapia, Olga, Vanesa Lafarga, Rocío Bengoechea, Ana Palanca, Miguel Lafarga, and María T. Berciano. 2014. “The SMN Tudor SIM-like Domain Is Key to SmD1 and Coilin Interactions and to Cajal Body Biogenesis.” *Journal of Cell Science*, January, jcs.138537. <https://doi.org/10.1242/jcs.138537>.
- Tarabal, Olga, Víctor Caraballo-Miralles, Andrea Cardona-Rossinyol, Francisco J. Correa, Gabriel Olmos, Jerònia Lladó, Josep E. Esquerda, and Jordi Calderó. 2014. “Mechanisms Involved in Spinal Cord Central Synapse Loss in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy.” *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 73 (6): 519–35. <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000074>.
- Tedesco, Francesco S., and Giulio Cossu. 2012. “Stem Cell Therapies for Muscle Disorders.” *Current Opinion in Neurology* 25 (5): 597–603. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e328357f288>.
- Tejero, Rocío, Stefanie Balk, Julio Franco-Espin, Jorge Ojeda, Luisa Hennlein, Hans Drexl, Benjamin Dombert, et al. 2020. “R-Roscovitine Improves Motoneuron Function in Mouse Models for Spinal Muscular Atrophy.” *iScience* 23 (2): 100826. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.100826>.
- Tejero, Rocío, Mario Lopez-Manzaneda, Saravanan Arumugam, and Lucía Tabares. 2016. “Synaptotagmin-2, and -1, Linked to Neurotransmission Impairment and Vulnerability in Spinal Muscular Atrophy.” *Human Molecular Genetics* 25 (21): 4703–16. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw297>.
- Terada, Naohiro, Takashi Hamazaki, Masahiro Oka, Masanori Hoki, Diana M. Mastalerz, Yuka Nakano, Edwin M. Meyer, Laurence Morel, Bryon E. Petersen, and Edward W. Scott. 2002. “Bone Marrow Cells Adopt the Phenotype of Other Cells by Spontaneous Cell Fusion.” *Nature* 416 (6880): 542–45. <https://doi.org/10.1038/nature730>.
- Terenghi, Giorgio. 1999. “Peripheral Nerve Regeneration and Neurotrophic Factors.” *Journal of Anatomy* 194 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1999.19410001.x>.
- Theeuwes, W. F., H. R. Gosker, R. C. J. Langen, K. J. P. Verhees, N. a. M. Pansters, A. M. W. J. Schols, and A. H. V. Remels. 2017. “Inactivation of Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) Enhances Skeletal Muscle Oxidative Metabolism.” *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease* 1863 (12): 3075–86. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.09.018>.
- Theodorou, L., P. Nicolaou, P. Koutsou, A. Georghiou, V. Anastasiadou, G. Tanteles, T. Kyriakides, E. Zamba-Papanicolaou, and K. Christodoulou. 2015. “Genetic Findings of Cypriot Spinal Muscular Atrophy Patients.” *Neurological Sciences* 36 (10): 1829–34. <https://doi.org/10.1007/s10072-015-2263-5>.
- Thirunavukkarasu, Balamurugan, Kirti Gupta, Akriti Bansal, Narendran Dhanasekaran, and Arun Baranwal. 2020. “Spinal Muscular Atrophy: Autopsy Based Neuropathological Demonstration.” *Neurology India* 68 (4): 882–85. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.293477>.
- Thompson, Luke W., Kim D. Morrison, Sally L. Shirran, Ewout J. N. Groen, Thomas H. Gillingwater, Catherine H. Botting, and Judith E. Sleeman. 2018. “Neurochondrin Interacts with the SMN Protein Suggesting a Novel Mechanism for Spinal Muscular Atrophy Pathology.” *Journal of Cell Science* 131 (8). <https://doi.org/10.1242/jcs.211482>.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, and J. M. Jones. 1998. “Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts.” *Science (New York, N.Y.)* 282 (5391): 1145–47. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>.



- Thomson, Sophie R., Joya E. Nahon, Chantal A. Mutsaers, Derek Thomson, Gillian Hamilton, Simon H. Parson, and Thomas H. Gillingwater. 2012. "Morphological Characteristics of Motor Neurons Do Not Determine Their Relative Susceptibility to Degeneration in a Mouse Model of Severe Spinal Muscular Atrophy." *PLoS One* 7 (12): e52605. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052605>.
- Thomson, Sophie R., Thomas M. Wishart, Rickie Patani, Siddharthan Chandran, and Thomas H. Gillingwater. 2012. "Using Induced Pluripotent Stem Cells (iPSC) to Model Human Neuromuscular Connectivity: Promise or Reality?" *Journal of Anatomy* 220 (2): 122–30. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2011.01459.x>.
- Tiburcy, Malte, James E. Hudson, Paul Balfanz, Susanne Schlick, Tim Meyer, Mei-Ling Chang Liao, Elif Levent, et al. 2017. "Defined Engineered Human Myocardium With Advanced Maturation for Applications in Heart Failure Modeling and Repair." *Circulation* 135 (19): 1832–47. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024145>.
- Tintignac, Lionel A., Hans-Rudolf Brenner, and Markus A. Rüegg. 2015. "Mechanisms Regulating Neuromuscular Junction Development and Function and Causes of Muscle Wasting." *Physiological Reviews* 95 (3): 809–52. <https://doi.org/10.1152/physrev.00033.2014>.
- Torres-Benito, Laura, Rocío Ruiz, and Lucía Tabares. 2012. "Synaptic Defects in Spinal Muscular Atrophy Animal Models." *Developmental Neurobiology* 72 (1): 126–33. <https://doi.org/10.1002/dneu.20912>.
- Torres-Benito, Laura, Svenja Schneider, Roman Rombo, Karen K. Ling, Vanessa Grysko, Aaradhita Upadhyay, Natalia L. Kononenko, Frank Rigo, C. Frank Bennett, and Brunhilde Wirth. 2019. "NCALD Antisense Oligonucleotide Therapy in Addition to Nusinersen Further Ameliorates Spinal Muscular Atrophy in Mice." *American Journal of Human Genetics* 105 (1): 221–30. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.05.008>.
- Tosolini, Andrew P., and James N. Sleight. 2017. "Motor Neuron Gene Therapy: Lessons from Spinal Muscular Atrophy for Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10 (December): 405. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00405>.
- Touboul, Thomas, Nicholas R. F. Hannan, Sébastien Corbinau, Amélie Martinez, Clémence Martinet, Sophie Branchereau, Sylvie Mainot, et al. 2010. "Generation of Functional Hepatocytes from Human Embryonic Stem Cells under Chemically Defined Conditions That Recapitulate Liver Development." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 51 (5): 1754–65. <https://doi.org/10.1002/hep.23506>.
- Tripsianes, Konstantinos, Tobias Madl, Martin Machyna, Dimitrios Fessas, Clemens Englbrecht, Utz Fischer, Karla M. Neugebauer, and Michael Sattler. 2011. "Structural Basis for Dimethylarginine Recognition by the Tudor Domains of Human SMN and SPF30 Proteins." *Nature Structural & Molecular Biology* 18 (12): 1414–20. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2185>.
- Tsai, Li-Kai, Ming-Shiun Tsai, Chen-Hung Ting, Sue-Hong Wang, and Hung Li. 2008. "Restoring Bcl-XL Levels Benefits a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy." *Neurobiology of Disease* 31 (3): 361–67. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.05.014>.
- Tsai, Li-Kai, Ming-Shung Tsai, Tzer-Bin Lin, Wuh-Liang Hwu, and Hung Li. 2006. "Establishing a Standardized Therapeutic Testing Protocol for Spinal Muscular Atrophy." *Neurobiology of Disease* 24 (2): 286–95. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.07.004>.
- Tsai, Ming S., Yung T. Chiu, Sue H. Wang, Hsiu M. Hsieh-Li, Wei C. Lian, and Hung Li. 2006. "Abolishing Bax-Dependent Apoptosis Shows Beneficial Effects on Spinal Muscular Atrophy Model Mice." *Molecular Therapy* 13 (6): 1149–55. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.02.008>.
- Tseng, Yu-Ting, Cheng-Sheng Chen, Yuh-Jyh Jong, Fang-Rong Chang, and Yi-Ching Lo. 2016. "Loganin Possesses Neuroprotective Properties, Restores SMN Protein and Activates Protein Synthesis Positive Regulator Akt/MTOR in Experimental Models of Spinal Muscular Atrophy." *Pharmacological Research* 111 (September): 58–75. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.05.023>.
- Tsutsui, Hideaki, Bahram Valamehr, Antreas Hindoyan, Rong Qiao, Xiangting Ding, Shuling Guo, Owen N. Witte, Xin Liu, Chih-Ming Ho, and Hong Wu. 2011. "AN OPTIMIZED SMALL MOLECULE INHIBITOR COCKTAIL SUPPORTS LONG-TERM MAINTENANCE OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS." *Nature Communications* 2 (January): 167. <https://doi.org/10.1038/ncomms1165>.
- Turner, Nicholas, and Richard Grose. 2010. "Fibroblast Growth Factor Signalling: From Development to Cancer." *Nature Reviews Cancer* 10 (2): 116–29. <https://doi.org/10.1038/nrc2780>.
- Ueta, Ryo, Satoshi Sugita, Yoshihiko Minegishi, Akira Shimotoyodome, Noriyasu Ota, Noboru Ogiso, Takahiro Eguchi, and Yuji Yamanashi. 2020. "DOK7 Gene Therapy Enhances Neuromuscular Junction Innervation and Motor Function in Aged Mice." *iScience* 23 (8): 101385. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101385>.
- Ungrin, Mark D., Chirag Joshi, Andra Nica, Céline Bauwens, and Peter W. Zandstra. 2008. "Reproducible, Ultra High-Throughput Formation of Multicellular Organization from Single Cell Suspension-Derived Human

- Embryonic Stem Cell Aggregates." *PLoS ONE* 3 (2): e1565. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001565>.
- Valenzuela, David M., Trevor N. Stitt, Peter S. DiStefano, Eduardo Rojas, Karen Mattsson, Debra L. Compton, Lorna Nunez, et al. 1995. "Receptor Tyrosine Kinase Specific for the Skeletal Muscle Lineage: Expression in Embryonic Muscle, at the Neuromuscular Junction, and after Injury." *Neuron* 15 (3): 573–84. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90146-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90146-9).
- Valetdinova, K. R., M. A. Maretina, M. L. Kuranova, E. V. Grigor'eva, Y. M. Minina, E. A. Kizilova, A. V. Kiselev, S. P. Medvedev, V. S. Baranov, and S. M. Zakian. 2019. "Generation of Two Spinal Muscular Atrophy (SMA) Type I Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC) Lines and Two SMA Type II Patient-Derived iPSC Lines." *Stem Cell Research* 34 (January): 101376. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.101376>.
- Valori, C. F., K. Ning, M. Wyles, R. J. Mead, A. J. Grierson, P. J. Shaw, and M. Azzouz. 2010. "Systemic Delivery of ScAAV9 Expressing SMN Prolongs Survival in a Model of Spinal Muscular Atrophy." *Science Translational Medicine* 2 (35): 35ra42–35ra42. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000830>.
- Valsecchi, Valeria, Marina Boido, Elena De Amicis, Antonio Piras, and Alessandro Vercelli. 2015. "Expression of Muscle-Specific miRNA 206 in the Progression of Disease in a Murine SMA Model." *PLoS ONE* 10 (6): e0128560. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128560>.
- Van Alstyne, Meaghan, Christian M. Simon, S. Pablo Sardi, Lamya S. Shihabuddin, George Z. Mentis, and Livio Pellizzoni. 2018. "Dysregulation of Mdm2 and Mdm4 Alternative Splicing Underlies Motor Neuron Death in Spinal Muscular Atrophy." *Genes & Development* 32 (15–16): 1045–59. <https://doi.org/10.1101/gad.316059.118>.
- Van Alstyne, Meaghan, Ivan Tattoli, Nicolas Delestrée, Yocelyn Recinos, Eileen Workman, Lamya S. Shihabuddin, Chaolin Zhang, George Z. Mentis, and Livio Pellizzoni. 2021. "Gain of Toxic Function by Long-Term AAV9-Mediated SMN Overexpression in the Sensorimotor Circuit." *Nature Neuroscience*, April. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00827-3>.
- Vandamme, Céline, Oumeya Adjali, and Federico Mingozzi. 2017. "Unraveling the Complex Story of Immune Responses to AAV Vectors Trial After Trial." *Human Gene Therapy* 28 (11): 1061–74. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.150>.
- Vazquez-Arango, Pilar, Jane Vowles, Cathy Browne, Elizabeth Hartfield, Hugo J. R. Fernandes, Berhan Mandefro, Dhruv Sareen, et al. 2016. "Variant U1 snRNAs Are Implicated in Human Pluripotent Stem Cell Maintenance and Neuromuscular Disease." *Nucleic Acids Research* 44 (22): 10960–73. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw711>.
- Verhaart, Ingrid E. C., Agata Robertson, Ian J. Wilson, Annemieke Aartsma-Rus, Shona Cameron, Cynthia C. Jones, Suzanne F. Cook, and Hanns Lochmüller. 2017. "Prevalence, Incidence and Carrier Frequency of 5q-Linked Spinal Muscular Atrophy - a Literature Review." *Orphanet Journal of Rare Diseases* 12 (1): 124. <https://doi.org/10.1186/s13023-017-0671-8>.
- Vezain, Myriam, Pascale Saugier-veber, Elisa Goïna, Renaud Touraine, Véronique Manel, Annick Toutain, Séverine Fehrenbach, et al. 2010. "A Rare SMN2 Variant in a Previously Unrecognized Composite Splicing Regulatory Element Induces Exon 7 Inclusion and Reduces the Clinical Severity of Spinal Muscular Atrophy." *Human Mutation* 31 (1): E1110–1125. <https://doi.org/10.1002/humu.21173>.
- Vila, Olaia F., Sebastien G. M. Uzel, Stephen P. Ma, Damian Williams, Joseph Pak, Roger D. Kamm, and Gordana Vunjak-Novakovic. 2019. "Quantification of Human Neuromuscular Function through Optogenetics." *Theranostics* 9 (5): 1232–46. <https://doi.org/10.7150/thno.25735>.
- Vitali, T., V. Sossi, F. Tiziano, S. Zappata, A. Giuli, M. Paravatou-Petsotas, G. Neri, and C. Brahe. 1999. "Detection of the Survival Motor Neuron (SMN) Genes by FISH: Further Evidence for a Role for SMN2 in the Modulation of Disease Severity in SMA Patients." *Human Molecular Genetics* 8 (13): 2525–32. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.13.2525>.
- Vitte, Jérémie M., Bénédicte Davoult, Natacha Roblot, Michèle Mayer, Vandana Joshi, Sabrina Courageot, François Tronche, et al. 2004. "Deletion of Murine Smn Exon 7 Directed to Liver Leads to Severe Defect of Liver Development Associated with Iron Overload." *The American Journal of Pathology* 165 (5): 1731–41. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63428-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63428-1).
- Vry, Julia, Isabel J. Schubert, Oliver Semler, Verena Haug, Eckhard Schönau, and Janbernd Kirschner. 2014. "Whole-Body Vibration Training in Children with Duchenne Muscular Dystrophy and Spinal Muscular Atrophy." *European Journal of Paediatric Neurology* 18 (2): 140–49. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2013.09.005>.
- Vukojicic, Aleksandra, Nicolas Delestrée, Emily V. Fletcher, John G. Pagiazitis, Sethu Sankaranarayanan, Ted A. Yednock, Ben A. Barres, and George Z. Mentis. 2019. "The Classical Complement Pathway Mediates Microglia-Dependent Remodeling of Spinal Motor Circuits during Development and in SMA." *Cell*

- Reports* 29 (10): 3087-3100.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.013>.
- Wadman, R. I., M. Stam, M. Gijzen, H. H. Lemmink, I. N. Snoeck, C. A. Wijngaarde, K. P. Braun, et al. 2017. "Association of Motor Milestones, SMN2 Copy and Outcome in Spinal Muscular Atrophy Types 0-4." *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, January. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2016-314292>.
- Wadman, Renske I., Wendy M. J. Bosboom, W. Ludo van der Pol, Leonard H. van den Berg, John H. J. Wokke, Susan T. Iannaccone, and Alexander F. F. J. E. Vrancken. 2012. "Drug Treatment for Spinal Muscular Atrophy Type I." *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, no. 4 (April): CD006281. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006281.pub4>.
- Wadman, Renske I, W Ludo van der Pol, Wendy MJ Bosboom, Fay-Lynn Asselman, Leonard H van den Berg, Susan T Iannaccone, and Alexander FJE Vrancken. 2020. "Drug Treatment for Spinal Muscular Atrophy Types II and III." Edited by Cochrane Neuromuscular Group. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, January. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006282.pub5>.
- Wadman, Renske I., Alexander F. J. E. Vrancken, Leonard H. van den Berg, and W. Ludo van der Pol. 2012. "Dysfunction of the Neuromuscular Junction in Spinal Muscular Atrophy Types 2 and 3." *Neurology* 79 (20): 2050–55. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182749eca>.
- Wallace, B. G. 1989. "Agrin-Induced Specializations Contain Cytoplasmic, Membrane, and Extracellular Matrix-Associated Components of the Postsynaptic Apparatus." *Journal of Neuroscience* 9 (4): 1294–1302. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-04-01294.1989>.
- Wasserman, Halley M., Lindsey N. Hornung, Peggy J. Stenger, Meilan M. Rutter, Brenda L. Wong, Irina Rybalsky, Jane C. Khoury, and Heidi J. Kalkwarf. 2017. "Low Bone Mineral Density and Fractures Are Highly Prevalent in Pediatric Patients with Spinal Muscular Atrophy Regardless of Disease Severity." *Neuromuscular Disorders : NMD* 27 (4): 331–37. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2017.01.019>.
- Watanabe, Kiichi, Morio Ueno, Daisuke Kamiya, Ayaka Nishiyama, Michiru Matsumura, Takafumi Wataya, Jun B. Takahashi, et al. 2007. "A ROCK Inhibitor Permits Survival of Dissociated Human Embryonic Stem Cells." *Nature Biotechnology* 25 (6): 681–86. <https://doi.org/10.1038/nbt1310>.
- Weber, Jonasz Jeremiasz, Laura Emily Clemensson, Helgi Birgir Schiöth, and Huu Phuc Nguyen. 2019. "Olesoxime in Neurodegenerative Diseases: Scrutinising a Promising Drug Candidate." *Biochemical Pharmacology* 168 (October): 305–18. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.07.002>.
- Weiss, Manfred S., Kay Diederichs, Randy J. Read, Santosh Panjekar, Gregory D. Van Duyne, A. Gregory Matera, Utz Fischer, and Clemens Grimm. 2016. "A Critical Examination of the Recently Reported Crystal Structures of the Human SMN Protein." *Human Molecular Genetics* 25 (21): 4717–25. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw298>.
- Welby, Emily, Rebecca J. Rehborg, Matthew Harmelink, and Allison D. Ebert. 2021. "Assessment of CSF Biomarkers and MicroRNA-Mediated Disease Mechanisms in SMA." <https://doi.org/10.1101/2021.05.19.444816>.
- Weng, Wen-Chin, Yu-Kan Hsu, Fu-Man Chang, Chun-Yen Lin, Wuh-Liang Hwu, Wang-Tso Lee, Ni-Chung Lee, and Yin-Hsiu Chien. 2021. "CMAP Changes upon Symptom Onset and during Treatment in Spinal Muscular Atrophy Patients: Lessons Learned from Newborn Screening." *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics* 23 (2): 415–20. <https://doi.org/10.1038/s41436-020-00987-w>.
- Werdnig, G. 1891. "Zwei frühinfantile hereditäre Fälle von progressiver Muskelatrophie unter dem Bilde der Dystrophie, aber anf neurotischer Grundlage." *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 22 (2): 437–80. <https://doi.org/10.1007/BF01776636>.
- Wheeler, T. M., M. C. Krym, and C. A. Thornton. 2007. "Ribonuclear Foci at the Neuromuscular Junction in Myotonic Dystrophy Type 1." *Neuromuscular Disorders: NMD* 17 (3): 242–47. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2006.12.015>.
- Wichterle, Hynek, Ivo Lieberam, Jeffery A. Porter, and Thomas M. Jessell. 2002. "Directed Differentiation of Embryonic Stem Cells into Motor Neurons." *Cell* 110 (3): 385–97. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00835-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00835-8).
- Wijngaarde, C. A., A. C. Blank, M. Stam, R. I. Wadman, L. H. van den Berg, and W. L. van der Pol. 2017. "Cardiac Pathology in Spinal Muscular Atrophy: A Systematic Review." *Orphanet Journal of Rare Diseases* 12 (1): 67. <https://doi.org/10.1186/s13023-017-0613-5>.
- Williams, Luis A., Brandi N. Davis-Dusenbery, and Kevin C. Eggan. 2012. "SnapShot: Directed Differentiation of Pluripotent Stem Cells." *Cell* 149 (5): 1174-1174.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.015>.
- Williams, Thomas L., Maria T. Colzani, Robyn G. C. Macrae, Emma L. Robinson, Stuart Bloor, Edward J. D. Greenwood, Jun Ru Zhan, et al. 2021. "Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Platform Screens Inhibitors of SARS-CoV-2 Infection." *Communications Biology* 4 (1): 1–8.

- <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02453-y>.
- Wilmut, I., A. E. Schnieke, J. McWhir, A. J. Kind, and K. H. S. Campbell. 1997. "Viable Offspring Derived from Fetal and Adult Mammalian Cells." *Nature* 385 (6619): 810–13. <https://doi.org/10.1038/385810a0>.
- Wimmer, Reiner A., Alexandra Leopoldi, Martin Aichinger, Dentscho Kerjaschki, and Josef M. Penninger. 2019. "Generation of Blood Vessel Organoids from Human Pluripotent Stem Cells." *Nature Protocols* 14 (11): 3082–3100. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0213-z>.
- Wirth, B. 2000. "An Update of the Mutation Spectrum of the Survival Motor Neuron Gene (SMN1) in Autosomal Recessive Spinal Muscular Atrophy (SMA)." *Human Mutation* 15 (3): 228–37. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(200003\)15:3<228::AID-HUMU3>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(200003)15:3<228::AID-HUMU3>3.0.CO;2-9).
- Wirth, B., L. Brichta, B. Schrank, H. Lochmüller, S. Blick, A. Baasner, and R. Heller. 2006. "Mildly Affected Patients with Spinal Muscular Atrophy Are Partially Protected by an Increased SMN2 Copy Number." *Human Genetics* 119 (4): 422–28. <https://doi.org/10.1007/s00439-006-0156-7>.
- Wirth, Brunhilde. 2021. "Spinal Muscular Atrophy: In the Challenge Lies a Solution." *Trends in Neurosciences* 44 (4): 306–22. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.11.009>.
- Wirth, Brunhilde, Mert Karakaya, Min Jeong Kye, and Natalia Mendoza-Ferreira. 2020. "Twenty-Five Years of Spinal Muscular Atrophy Research: From Phenotype to Genotype to Therapy, and What Comes Next." *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 21 (August): 231–61. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-102319-103602>.
- Wirth, Brunhilde, Thorsten Schmidt, Eric Hahnen, Sabine Rudnik-Schöneborn, Michael Krawczak, Bertram Müller-Myhsok, Jutta Schönling, and Klaus Zerres. 1997. "De Novo Rearrangements Found in 2% of Index Patients with Spinal Muscular Atrophy: Mutational Mechanisms, Parental Origin, Mutation Rate, and Implications for Genetic Counseling." *The American Journal of Human Genetics* 61 (5): 1102–11. <https://doi.org/10.1086/301608>.
- Wishart, Thomas M., Jack P.-W. Huang, Lyndsay M. Murray, Douglas J. Lamont, Chantal A. Mutsaers, Jenny Ross, Pascal Geldsetzer, et al. 2010. "SMN Deficiency Disrupts Brain Development in a Mouse Model of Severe Spinal Muscular Atrophy." *Human Molecular Genetics* 19 (21): 4216–28. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq340>.
- Wishart, Thomas M., Chantal A. Mutsaers, Markus Riessland, Michell M. Reimer, Gillian Hunter, Marie L. Hannam, Samantha L. Eaton, et al. 2014. "Dysregulation of Ubiquitin Homeostasis and  $\beta$ -Catenin Signaling Promote Spinal Muscular Atrophy." *The Journal of Clinical Investigation* 124 (4): 1821–34. <https://doi.org/10.1172/JCI71318>.
- Wohlfart, G., J. Fex, and S. Eliasson. 1955. "Hereditary Proximal Spinal Muscular Atrophy, a Clinical Entity Simulating Progressive Muscular Dystrophy." *Acta Psychiatrica Et Neurologica Scandinavica* 30 (1–2): 395–406.
- Wood, Sarah J, and Clarke R. Slater. 2001. "Safety Factor at the Neuromuscular Junction." *Progress in Neurobiology* 64 (4): 393–429. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(00\)00055-1](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(00)00055-1).
- Workman, Eileen, Luciano Saieva, Tessa L. Carrel, Thomas O. Crawford, Don Liu, Cathleen Lutz, Christine E. Beattie, Livio Pellizzoni, and Arthur H. M. Burghes. 2009. "A SMN Missense Mutation Complements SMN2 Restoring SnRNPs and Rescuing SMA Mice." *Human Molecular Genetics* 18 (12): 2215–29. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp157>.
- Wouters, Olivier J., Martin McKee, and Jeroen Luyten. 2020. "Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018." *JAMA* 323 (9): 844–53. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1166>.
- Wu, Haitao, Yisheng Lu, Chengyong Shen, Neil Patel, Lin Gan, Wen C. Xiong, and Lin Mei. 2012. "Distinct Roles of Muscle and Motoneuron LRP4 in Neuromuscular Junction Formation." *Neuron* 75 (1): 94–107. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.04.033>.
- Wurster, Claudia D., Benedikt Winter, Kurt Wollinsky, Albert C. Ludolph, Zeljko Uzelac, Simon Witzel, Michael Schocke, Ralf Schneider, and Tugrul Kocak. 2019. "Intrathecal Administration of Nusinersen in Adolescent and Adult SMA Type 2 and 3 Patients." *Journal of Neurology* 266 (1): 183–94. <https://doi.org/10.1007/s00415-018-9124-0>.
- Xie, Wei, Matthew D. Schultz, Ryan Lister, Zhonggang Hou, Nisha Rajagopal, Pradipta Ray, John W. Whitaker, et al. 2013. "Epigenomic Analysis of Multilineage Differentiation of Human Embryonic Stem Cells." *Cell* 153 (5): 1134–48. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.022>.
- Xu, Chong-Chong, Kyle R. Denton, Zhi-Bo Wang, Xiaoqing Zhang, and Xue-Jun Li. 2016. "Abnormal Mitochondrial Transport and Morphology as Early Pathological Changes in Human Models of Spinal Muscular Atrophy." *Disease Models & Mechanisms* 9 (1): 39–49. <https://doi.org/10.1242/dmm.021766>.
- Yamanaka, Koji, Seung Joo Chun, Severine Boillee, Noriko Fujimori-Tonou, Hirofumi Yamashita, David H.

- Gutmann, Ryosuke Takahashi, Hidemi Misawa, and Don W. Cleveland. 2008. "Astrocytes as Determinants of Disease Progression in Inherited Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Nature Neuroscience* 11 (3): 251–53. <https://doi.org/10.1038/nn2047>.
- Yamanaka, Shinya, and Helen M. Blau. 2010. "Nuclear Reprogramming to a Pluripotent State by Three Approaches." *Nature* 465 (7299): 704–12. <https://doi.org/10.1038/nature09229>.
- Yang, Lei, Mark H. Soonpaa, Eric D. Adler, Torsten K. Roepke, Steven J. Kattman, Marion Kennedy, Els Henckaerts, et al. 2008. "Human Cardiovascular Progenitor Cells Develop from a KDR+ Embryonic-Stem-Cell-Derived Population." *Nature* 453 (7194): 524–28. <https://doi.org/10.1038/nature06894>.
- Yang, Wenli, Ying Liu, Katherine J. Slovik, Joseph C. Wu, Stephen A. Duncan, Daniel J. Rader, and Edward E. Morrisey. 2015. "Generation of iPSCs as a Pooled Culture Using Magnetic Activated Cell Sorting of Newly Reprogrammed Cells." *PLOS ONE* 10 (8): e0134995. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134995>.
- Yang, Yin M., Shailesh K. Gupta, Kevin J. Kim, Berit E. Powers, Antonio Cerqueira, Brian J. Wainger, Hien D. Ngo, et al. 2013. "A Small Molecule Screen in Stem-Cell-Derived Motor Neurons Identifies a Kinase Inhibitor as a Candidate Therapeutic for ALS." *Cell Stem Cell* 12 (6): 713–26. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.04.003>.
- Yanyan, Cao, Qu Yujin, Bai Jinli, Jin Yuwei, Wang Hong, and Song Fang. 2014. "Correlation of PLS3 Expression with Disease Severity in Children with Spinal Muscular Atrophy." *Journal of Human Genetics* 59 (1): 24–27. <https://doi.org/10.1038/jhg.2013.111>.
- Yarza, Ramon, Silvia Vela, Maite Solas, and Maria J. Ramirez. 2015. "C-Jun N-Terminal Kinase (JNK) Signaling as a Therapeutic Target for Alzheimer's Disease." *Frontiers in Pharmacology* 6: 321. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00321>.
- Yener, İnci Hande, Haluk Topaloglu, Sevim Erdem-Özdamar, and Didem Dayangac-Erden. 2017. "Transcript Levels of Plastin 3 and Neuritin 1 Modifier Genes in Spinal Muscular Atrophy Siblings." *Pediatrics International* 59 (1): 53–56. <https://doi.org/10.1111/ped.13052>.
- Yeo, Crystal Jing Jing, and Basil T. Darras. 2020. "Overturning the Paradigm of Spinal Muscular Atrophy as Just a Motor Neuron Disease." *Pediatric Neurology* 109 (August): 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2020.01.003>.
- Ying, Qi-Long, Jennifer Nichols, Edward P. Evans, and Austin G. Smith. 2002. "Changing Potency by Spontaneous Fusion." *Nature* 416 (6880): 545–48. <https://doi.org/10.1038/nature729>.
- Yonekawa, Takahiro, Hirofumi Komaki, Yuko Saito, Kenji Sugai, and Masayuki Sasaki. 2013. "Peripheral Nerve Abnormalities in Pediatric Patients with Spinal Muscular Atrophy." *Brain & Development* 35 (2): 165–71. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2012.03.009>.
- Yoshida, Michiko, Shiho Kitaoka, Naohiro Egawa, Mayu Yamane, Ryunosuke Ikeda, Kayoko Tsukita, Naoki Amano, et al. 2015. "Modeling the Early Phenotype at the Neuromuscular Junction of Spinal Muscular Atrophy Using Patient-Derived iPSCs." *Stem Cell Reports* 4 (4): 561–68. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.02.010>.
- Young, Joanne, Yoran Margaron, Mathieu Fernandes, Eve Duchemin-Pelletier, Joris Michaud, Mélanie Flaender, Oana Lorintiu, Sébastien Degot, and Pauline Poydenot. 2018. "MyoScreen, a High-Throughput Phenotypic Screening Platform Enabling Muscle Drug Discovery." *SLAS DISCOVERY: Advancing the Science of Drug Discovery* 23 (8): 790–806. <https://doi.org/10.1177/2472555218761102>.
- Young, P. J., T. T. Le, N. thi Man, A. H. Burghes, and G. E. Morris. 2000. "The Relationship between SMN, the Spinal Muscular Atrophy Protein, and Nuclear Coiled Bodies in Differentiated Tissues and Cultured Cells." *Experimental Cell Research* 256 (2): 365–74. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.4858>.
- Young, Philip J., Patricia M. Day, Jianhua Zhou, Elliot J. Androphy, Glenn E. Morris, and Christian L. Lorson. 2002. "A Direct Interaction between the Survival Motor Neuron Protein and P53 and Its Relationship to Spinal Muscular Atrophy \*." *Journal of Biological Chemistry* 277 (4): 2852–59. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108769200>.
- Younis, Ihab, Michael Berg, Daisuke Kaida, Kimberly Dittmar, Congli Wang, and Gideon Dreyfuss. 2010. "Rapid-Response Splicing Reporter Screens Identify Differential Regulators of Constitutive and Alternative Splicing." *Molecular and Cellular Biology* 30 (7): 1718–28. <https://doi.org/10.1128/MCB.01301-09>.
- Yu, Junying, Maxim A. Vodyanik, Ping He, Igor I. Slukvin, and James A. Thomson. 2006. "Human Embryonic Stem Cells Reprogram Myeloid Precursors Following Cell-Cell Fusion." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 24 (1): 168–76. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0292>.
- Yu, Junying, Maxim A. Vodyanik, Kim Smuga-Otto, Jessica Antosiewicz-Bourget, Jennifer L. Frane, Shulan Tian, Jeff Nie, et al. 2007. "Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells." *Science (New York, N.Y.)* 318 (5858): 1917–20. <https://doi.org/10.1126/science.1151526>.
- Yumoto, Norihiro, Natalie Kim, and Steven J. Burden. 2012. "Lrp4 Is a Retrograde Signal for Presynaptic

- Differentiation at Neuromuscular Synapses." *Nature* 489 (7416): 438–42. <https://doi.org/10.1038/nature11348>.
- Zahavi, Eitan Erez, Ariel Ionescu, Shani Gluska, Tal Gradus, Keren Ben-Yaakov, and Eran Perlson. 2015. "A Compartmentalized Microfluidic Neuromuscular Co-Culture System Reveals Spatial Aspects of GDNF Functions." *Journal of Cell Science* 128 (6): 1241–52. <https://doi.org/10.1242/jcs.167544>.
- Zainul, Zarin, Anne Heikkinen, Hennariikka Koivisto, Iina Rautalahti, Mika Kallio, Shuo Lin, Heli Härönen, et al. 2018. "Collagen XIII Is Required for Neuromuscular Synapse Regeneration and Functional Recovery after Peripheral Nerve Injury." *Journal of Neuroscience* 38 (17): 4243–58. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3119-17.2018>.
- Zhang, Bin, Chuan Liang, Ryan Bates, Yiming Yin, Wen-Cheng Xiong, and Lin Mei. 2012. "Wnt Proteins Regulate Acetylcholine Receptor Clustering in Muscle Cells." *Molecular Brain* 5 (1): 7. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-5-7>.
- Zhang, Bin, Shiwen Luo, Qiang Wang, Tatsuo Suzuki, Wen C. Xiong, and Lin Mei. 2008. "LRP4 Serves as a Coreceptor of Agrin." *Neuron* 60 (2): 285–97. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.006>.
- Zhang, Bin, Wen C. Xiong, and Lin Mei. 2009. "Get Ready to Wnt: Prepatterning in Neuromuscular Junction Formation." *Developmental Cell* 16 (3): 325–27. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.03.001>.
- Zhang, Boyang, Miles Montgomery, M. Dean Chamberlain, Shinichiro Ogawa, Anastasia Korolj, Aric Pahnke, Laura A. Wells, et al. 2016. "Biodegradable Scaffold with Built-in Vasculature for Organ-on-a-Chip Engineering and Direct Surgical Anastomosis." *Nature Materials* 15 (6): 669–78. <https://doi.org/10.1038/nmat4570>.
- Zhang, Honglai, Lei Xing, Wilfried Rossoll, Hynek Wichterle, Robert H. Singer, and Gary J. Bassell. 2006. "Multiprotein Complexes of the Survival of Motor Neuron Protein SMN with Gemin Traffic to Neuronal Processes and Growth Cones of Motor Neurons." *The Journal of Neuroscience* 26 (33): 8622–32. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3967-05.2006>.
- Zhang, Jing, Adam J. Hirst, Fuyu Duan, Hui Qiu, Rujin Huang, Ying Ji, Lufeng Bai, et al. 2019. "Anti-Apoptotic Mutations Desensitize Human Pluripotent Stem Cells to Mitotic Stress and Enable Aneuploid Cell Survival." *Stem Cell Reports* 12 (3): 557–71. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.01.013>.
- Zhang, Kejing, Lei Bai, Wentao Xu, and Chengyong Shen. 2021. "Human Neuromuscular Junction Three-Dimensional Organoid Models and the Insight in Motor Disorders." *Journal of Molecular Cell Biology*, July, mjab046. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjab046>.
- Zhang, Rundong, Byung Ran So, Pilong Li, Jeongsik Yong, Tina Glisovic, Lili Wan, and Gideon Dreyfuss. 2011. "Structure of a Key Intermediate of the SMN Complex Reveals Gemin2's Crucial Function in SnRNP Assembly." *Cell* 146 (3): 384–95. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.043>.
- Zhang, Wei, Anne-Sophie Coldefy, Stevan R. Hubbard, and Steven J. Burden. 2011. "Agrin Binds to the N-Terminal Region of Lrp4 Protein and Stimulates Association between Lrp4 and the First Immunoglobulin-like Domain in Muscle-Specific Kinase (MuSK)." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (47): 40624–30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.279307>.
- Zhang, Zhenxi, Francesco Lotti, Kimberly Dittmar, Ihab Younis, Lili Wan, Mumtaz Kasim, and Gideon Dreyfuss. 2008. "SMN Deficiency Causes Tissue-Specific Perturbations in the Repertoire of SnRNAs and Widespread Defects in Splicing." *Cell* 133 (4): 585–600. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.031>.
- Zhang, Zhenxi, Anna Maria Pinto, Lili Wan, Wei Wang, Michael G. Berg, Isabela Oliva, Larry N. Singh, Christopher Dengler, Zhi Wei, and Gideon Dreyfuss. 2013. "Dysregulation of Synaptogenesis Genes Antecedes Motor Neuron Pathology in Spinal Muscular Atrophy." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (48): 19348–53. <https://doi.org/10.1073/pnas.1319280110>.
- Zhao, Dorothy Yanling, Gerald Gish, Ulrich Braunschweig, Yue Li, Zuyao Ni, Frank W. Schmitges, Guoqing Zhong, et al. 2016. "SMN and Symmetric Arginine Dimethylation of RNA Polymerase II C-Terminal Domain Control Termination." *Nature* 529 (7584): 48–53. <https://doi.org/10.1038/nature16469>.
- Zhou, Chunyi, Zhihua Feng, and Chien-Ping Ko. 2016. "Defects in Motoneuron–Astrocyte Interactions in Spinal Muscular Atrophy." *The Journal of Neuroscience* 36 (8): 2543–53. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3534-15.2016>.
- Zhou, Haiyan, Narinder Janghra, Chalermchai Mitrpant, Rachel L. Dickinson, Karen Anthony, Loren Price, Ian C. Eperon, Stephen D. Wilton, Jennifer Morgan, and Francesco Muntoni. 2013. "A Novel Morpholino Oligomer Targeting ISS-N1 Improves Rescue of Severe Spinal Muscular Atrophy Transgenic Mice." *Human Gene Therapy* 24 (3): 331–42. <https://doi.org/10.1089/hum.2012.211>.
- Ziegler, Lina, Sergei Grigoryan, In Hong Yang, Nitish V. Thakor, and Ronald S. Goldstein. 2011. "Efficient Generation of Schwann Cells from Human Embryonic Stem Cell-Derived Neurospheres." *Stem Cell Reviews and Reports* 7 (2): 394–403. <https://doi.org/10.1007/s12015-010-9198-2>.
- Zong, Yinong, Bin Zhang, Shenyan Gu, Kwangkook Lee, Jie Zhou, Guorui Yao, Dwight Figueiredo, Kay Perry, Lin

- Mei, and Rongsheng Jin. 2012. "Structural Basis of Agrin–LRP4–MuSK Signaling." *Genes & Development* 26 (3): 247–58. <https://doi.org/10.1101/gad.180885.111>.
- Zuluaga-Sanchez, Santiago, Megan Teynor, Christopher Knight, Robin Thompson, Thomas Lundqvist, Mats Ekelund, Annabelle Forsmark, Adrian D. Vickers, and Andrew Lloyd. 2019. "Cost Effectiveness of Nusinersen in the Treatment of Patients with Infantile-Onset and Later-Onset Spinal Muscular Atrophy in Sweden." *Pharmacoeconomics* 37 (6): 845–65. <https://doi.org/10.1007/s40273-019-00769-6>.
- Zusso, Morena, Valentina Lunardi, Davide Franceschini, Andrea Pagetta, Rita Lo, Stefano Stifani, Anna Chiara Frigo, Pietro Giusti, and Stefano Moro. 2019. "Ciprofloxacin and Levofloxacin Attenuate Microglia Inflammatory Response via TLR4/NF-KB Pathway." *Journal of Neuroinflammation* 16 (1): 148. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1538-9>.

## Article 4

En révision – Neuropathology and Applied Neurobiology – Janvier 2022

### Activating IRE1 $\alpha$ -XBP1 pathway in Spinal Muscular Atrophy promotes SMN expression and motor neuron survival

Domenico D'Amico<sup>1</sup>, Olivier Biondi<sup>1</sup>, Camille Januel<sup>2</sup>, Cynthia Bezier<sup>1</sup>, Delphine Sapaly<sup>1</sup>, Zoé Clerc<sup>1</sup>, Mirella El Khoury<sup>1</sup>, Venkat Krishnan Sundaram<sup>1</sup>, Léo Houdebine<sup>1</sup>, Thibaut Josse<sup>3</sup>, Bruno Della Gaspera<sup>1</sup>, Cécile Martinat<sup>2</sup>, Charbel Massaad<sup>1</sup>, Laure Weill<sup>1\*</sup>, Frédéric Charbonnier<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Université de Paris & Inserm UMR\_S1124, 45 rue des Saints-Pères, F-75270 Paris Cedex 06, France. Tel.: 33-1-4286-2153 Fax: 33-1-4286-2119.

<sup>2</sup>Université d'Evry-Val-d'Essonne & Inserm UMR 861, I-STEM, AFM, 28, Rue Henri Desbruères 91100 Corbeil-Essonnes, France.

<sup>3</sup>Université de Tours & CNRS UMR 7261, Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte, 37200 Tours, France.

#To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-1-4286-2153 Fax: 33-1-4286-2119; E-mail: frederic.charbonnier@u-paris.fr [laure.weill@u-paris.fr](mailto:laure.weill@u-paris.fr)

### ABSTRACT

**Aim:** Spinal muscular atrophy (SMA) is a neuromuscular disease caused by Survival of Motor Neuron (SMN) deficiency that induces motor neuron (MN) degeneration and severe muscular atrophy. Gene therapies that increase SMN have proven their efficacy but not for all patients. Here, we explored the UPR status in SMA pathology and established whether UPR modulation could be beneficial for SMA patients.

**Methods:** We analyzed the expression and activation of UPR key proteins by RT-qPCR and western blot in SMA patient iPSC-derived MNs and one SMA cell line in which SMN was re-expressed (rescue). We completed this using myoblast and fibroblast SMA patient cells and the spinal cord from SMA mouse models with varying severity. Finally, we tested *in vitro* and *in vivo* the restoration of IRE1/XBP1 pathway on SMN expression and neuroprotection.

**Results:** We reported that the IRE1 $\alpha$ /XBP1 branch of the unfolded protein response is disrupted in SMA, with a depletion of XBP1s irrespective of IRE1 $\alpha$  activation pattern. The overexpression of XBP1s in SMA fibroblasts proved to transcriptionally enhance SMN expression. In the spinal cord of severe SMA-like mice, IRE1 $\alpha$ /XBP1 pathway impairment is significantly limited by NMDA-receptor activation, previously evidenced as a neuroprotective treatment for SMA MNs. Importantly, rebalancing XBP1s expression in severe SMA-like mice, induced SMN expression and spinal MN protection.

**Conclusions:** We identified XBP1s depletion as a contributing factor in SMA pathogenesis, and the modulation of this transcription factor proves to be a plausible therapeutic avenue in the context of pharmacological interventions in patients.

**Keywords:** Unfolded protein response, Neuroprotection, spinal muscular atrophy, XBP1, IRE1, SMN



## INTRODUCTION

Spinal muscular atrophy (SMA) is a childhood neuromuscular disease caused by Survival of Motor Neuron 1 (*SMN1*) gene mutation or deletion and subsequent protein depletion [1]. SMA induces motor-neurons (MNs) degeneration leading to severe muscular atrophy and often to early death [2]. The severity of SMA is variable depending on the expression of *SMN2*, a gene copy of *SMN1*. Indeed, due to a polymorphism in exon-7, *SMN2* produces only a fraction of the full-length *SMN* mRNAs leading to the production of small amount of functional SMN protein [3]. Consequently, efforts to find a therapy for SMA have mainly focused on increasing full-length *SMN* expression in patients. Three therapies for SMA are available, based either on the promotion of exon-7 inclusion in *SMN2*-derived transcripts using specific Antisense Oligonucleotides [4–6] or the Ridisplam molecule [7], or on AAV-based *SMN1* gene replacement [8]. Although proven to alleviate SMA, these therapies do not constitute a cure for SMA, and are not efficient or applicable for all patients [6, 9–12]. Furthermore, the existence of AAV immunoreactivity limits *SMN* gene replacement by AAV [13]. Thus, novel therapeutics are needed to increase the number of treatment options for all patients, including original combination therapies.

We previously reported in several severe SMA mouse models, that increasing MN activity, either physiologically using physical exercise [14] or pharmacologically using agonists of NMDA receptors [15], promotes MN survival likely through SMN expression-promoting mechanisms that remain to be further investigated. Among these mechanisms, NMDA-receptor activation could trigger unfolded protein response (UPR) [16].

The UPR is an adaptive system activated when unfolded or misfolded proteins accumulate in the Endoplasmic Reticulum (ER) lumen. UPR is expected to restore normal cell function by primarily halting general translation, followed by degrading unfolded proteins and subsequently inducing the expression of chaperones involved in protein folding, such as the binding immunoglobulin protein BiP/GRP78 or Protein Disulfide Isomerases (PDIs). Thus, the UPR system restores the balance between folding capacity and demand through the activation of 3 branch-specific transcription factors *i.e.* XBP1, ATF4 or ATF6, respectively activated by inositol-requiring enzyme 1  $\alpha$  (IRE1 $\alpha$ , PKR-like ER kinase (PERK) or ATF6 [17]. Under normal conditions, IRE1 $\alpha$  binds BiP/GRP78 in an inactive complex. When unfolded proteins accumulate in the ER, BiP/GRP78 dissociates from IRE1 $\alpha$ , which then undergoes homodimerization and *trans*-autophosphorylation [18]. IRE1 $\alpha$  autophosphorylation results in the activation of its endoribonuclease domain [19] that catalyzes 26 nucleotide excision in unspliced *XBPI* (*XBPIu*) mRNA [20]. This *XBPI* mRNA splicing, which unconventionally occurs in the cytoplasm, generates spliced *XBPI* (*XBPIs*) with a new open reading frame encoding active form of XBP1 (XBPIs). The latter can enter into the nucleus, bind on cAMP response element (CRE) and activate transcription of its target genes, such as BiP/GRP78 or PDIs [20]. If this adaptive mechanism fails, the UPR switches to a pro-apoptotic mode, notably through the activation of the Regulated IRE1 $\alpha$ -Dependent Decay of mRNA (RIDD) [21] or the induction of CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) homologous protein (CHOP), both resulting in the activation of Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 (ASK1)-dependent signaling pathway [22].

Interestingly, using severe type patient induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived MNs and a mouse model of severe type SMA, Rubin's laboratory reported that activated UPR promoted SMA MN death and that *in vivo* inhibition of UPR increased SMA MN survival [23]. However, these data were unconfirmed by a follow-up study using also SMA iPSC-derived MNs [24]. This apparent discrepancy prompted us to explore the UPR status in two different cell lines of SMA patient iPSC-derived MNs and one SMA cell line in which SMN was re-expressed (rescue). We completed this *in vitro* study using myoblast and fibroblast SMA patient cells. Finally, we studied the spinal cord from different mouse models with varying disease severity. Our results suggest that the IRE1 $\alpha$ /XBP1 branch of the UPR is altered in SMA, with an overactivation of IRE1 $\alpha$  that is unexpectedly associated with a decrease in XBP1s expression. Importantly, XBP1s restoration promotes SMN expression *in vitro* and *in vivo* and MN survival in the spinal cord of severe SMA-like mice.

## RESULTS

### **XBP1s expression is impaired in hiPSC-derived motor neurons of severe type SMA Patients.**

Previous studies reported either enhanced [23] or unchanged [24] levels of XBP1s mRNA in MNs derived from iPSCs of SMA patients. To clarify the status of IRE1 $\alpha$ /XBP1 pathway in SMA MNs, we generated hiPSC-derived MNs from two different type I SMA patients (Cell lines 232C11 and 13C2) and two controls (Cell lines 56C2 and 14C5) [25]. Among the iPSC samples, we used one SMA (13C2) and one control (14C5) that displayed a direct familial link (mother and child) (Figure S1A). The other cell lines were totally independents. To attribute potential gene expression variation to SMN expression change, a plasmid expressing SMN was stably transfected in the 13C2 SMA hiPSC line (rescue). Moreover, we investigated IRE1 $\alpha$ /XBP1 pathway at two time points of MN differentiation, day 14 and 24, which correspond to new-born and mature MNs respectively [25]. SMN protein were significantly decreased in SMA hiPSC-derived MNs compared to controls, but highly re-expressed in the rescue (Figure S1B).

To assess the purity of MN in our cultures, we evaluated the percentage of MNs in control, SMA and rescue hiPSC-derived cultures using HB9 and ISL1 co-immunostaining (Figure S1C). As reported [25], we obtained around 70% of HB9 positive cells *i.e.* referred as MNs, in all cultures at day 14 (Figure S1D, E). We next evaluated MN survival from day 14 to day 24, by counting ISL1 positive cells. While no cell death could be recorded at day 14 in all conditions, we observed an increase of about 40% cell death at day 24 in SMA hiPSC-derived MNs compared to controls (Figure S1F). As expected, the level of cell death in rescue hiPSC was significantly lower than in SMA hiPSC and comparable to controls (Figure S1F).

We first analyzed the mRNA levels of the main effectors of IRE1 $\alpha$ /XBP1s pathway, namely *IRE1 $\alpha$* , *XBPIu* and *XBPIs*, and the XBP1s-target *BIP/GRP78* (Figure 1A, B; and Figure S2). We unexpectedly found a decrease in *XBPIs* expression in SMA hiPSC-derived MNs compared to controls. This decrease was significant at day 14 and but not at 24. Importantly, *XBPIs* mRNA expression reached levels comparable to controls in the rescue condition. No difference in *XBPIu*, *IRE1 $\alpha$*  and *BIP/GRP78* expression was witnessed irrespective of the time of differentiation (Figure 1A, B; and Figure S2). Moreover, *XBPIs* mRNA expression was significantly decreased in the 13C2 SMA MNs at day 14 compared to its family linked 14C5 control MNs (Figure 1C; and Figure S1).

Since these data suggested an inhibition of the IRE1 $\alpha$ /XBP1 pathway in SMA MNs, contrary to what was previously reported [23], we analyzed the protein expression of IRE1 $\alpha$  and XBP1s in SMA MNs. Importantly, and consistent with RNA results, XBP1s protein level at day 14 was decreased more than 50% compared to control hiPSC (Figure 1B). We then assessed the activation of IRE1 $\alpha$  in SMA MNs at day 14, and found no difference in phosphorylated IRE1 $\alpha$  or total IRE1 $\alpha$  expression levels. This disconnection between XBP1s expression and IRE1 $\alpha$  activation pattern occurred in the immature and mature MN (Figure S1F): despite significant overactivation of IRE1 $\alpha$  in SMA at 24 day, XBP1s expression is unchanged in SMA MNs compared to controls (Figure 1D). Thus, during SMA MN differentiation, XBP1s depletion unexpectedly precedes IRE1 $\alpha$  activation and, thereafter (D24), overactivated IRE1 $\alpha$  failed in producing large amounts of XBP1s compared to controls.

Because XBP1s depletion in SMA MNs might activate pro-apoptotic pathways, we analyzed the expression of *CHOP*, a marker of the shift from pro-survival to pro-apoptotic UPR. As shown in Figure S2, and in contrast to Ng's data [23], no alteration of *CHOP* expression could be evidenced in SMA hiPSC-derived MNs compared to controls.

These data indicate that IRE1 $\alpha$ /XBP1 pathway is compromised in SMA MNs, with an unexpected SMA-induced decrease in XBP1s expression which likely precedes MN cell death.

### **The IRE1 $\alpha$ /XBP1 branch of the UPR is compromised in non-neuronal SMA patient cells.**

SMA is not restricted to MNs and many tissues are affected by SMN depletion [36] including skeletal muscle that has been evidenced as a critical contributor to SMA physiopathology [37]. Thus, we investigated the status of IRE1 $\alpha$ /XBP1 pathway in several human SMA samples, including muscle cells. Thus, we studied the IRE1 $\alpha$ /XBP1 pathway in a primary culture of myotubes derived from a severe type SMA patient, after 40 days of differentiation [35]. We first analyzed at RNA level the expression levels of the main effectors of the pathway. We found that *XBPIu*, *XBPIs*, *BIP/GRP78* and *PDIA6* mRNAs were significantly downregulated in SMA myotubes compared to controls, whereas *IRE1 $\alpha$*  and

*PDIA4* mRNA levels remained unchanged (Figure 2A).

At the protein level, total IRE1 $\alpha$  expression significantly decreased associated with a 10-fold increase in IRE1 $\alpha$  phosphorylation in SMA myotubes compared to controls (Figure 2B). This overactivation of IRE1 $\alpha$  is disconnected from XBP1s production, since XBP1s protein reached almost undetectable levels in SMA myotubes, and the XBP1s-target BiP/GRP78 protein was dramatically reduced (Figure 2B).

We next investigated whether XBP1s depletion in SMA myotubes could induce pro-apoptotic pathways. We first analyzed the expression levels of *CHOP* mRNA and found a significant increase of this pro-apoptotic marker in SMA myotubes compared to controls (Figure 2A). We next analyzed the expression of *BLOS1*, a considered universal target of RIDD, which promotes apoptosis through IRE1 $\alpha$  nuclease activity [38]. No alteration of *BLOS1* mRNA levels could be evidenced in SMA myotubes compared to controls (Figure 2A).

We repeated this analysis in cultures of fibroblasts derived from a severe type SMA patient [32]. The SMA fibroblasts globally reproduced the picture of IRE1 $\alpha$ /XBP1 pathway impairments we found in SMA myotubes, except for *CHOP* expression (Figure 2C, D). Again, we found that a 10-fold IRE1 $\alpha$  overactivation associated with a significant decrease in XBP1s and its target BiP/GRP78 expression levels (Figure 2D).

These results confirm a dysfunction of the IRE1 $\alpha$ /XBP1 branch of the UPR in SMA with low expression of one main effector components of the pathway, namely XBP1s, despite overactivation of the pathway's initiator IRE1 $\alpha$ .

### **The activation of the IRE1 $\alpha$ -XBP1 pathway increases SMN expression levels in SMA fibroblasts.**

We next wondered whether XBP1s increase via UPR activation in SMA cells could be beneficial notably through SMN gene expression modulation. We treated SMA fibroblasts with thapsigargin (Tg), a general activator of the three UPR branches and analyzed IRE1 $\alpha$ /XBP1 components and SMN expression. Following Tg treatment, *IRE1 $\alpha$* , *XBP1s*, *BiP/GRP78* and *PDIA4* mRNA levels were significantly increased in comparison to DMSO-treated SMA fibroblasts (Figure 3A). As expected for the unspliced form of *XBP1*, *XBP1u* mRNA expression remained unchanged after Tg treatment. *BLOS1* mRNA was significantly decreased, as it could be expected for a RIDD target.

To investigate the effects of Tg on *SMN* expression, we quantified the fraction of exon-7-containing mRNA inside the population of *SMN* transcripts using RT-qPCR aimed at either amplifying the exon7-exon8 segment (E7-E8) or the constitutive exon2a-exon2b segment (E2a-E2b) (Figure 3B, C). After Tg treatment in SMA fibroblasts, *SMN* mRNA expression was significantly enhanced, with a more important increase for exon-7-containing transcripts compared to constitutive-exon transcripts, suggesting an exon-7 inclusion effect. All these data were confirmed at the protein level, notably the significant increase in XBP1s and SMN expression following UPR induction (Figure 3D).

To evaluate the contribution of IRE1 $\alpha$ /XBP1 pathway in SMN expression increase among the three UPR branches, we inhibited IRE1 $\alpha$  RNase activity with 4 $\mu$ 8c [39] in Tg-treated SMA fibroblasts. In these conditions and as anticipated, *XBP1s* mRNA expression decreased and *XBP1u* mRNA accumulated, with no change in the expression of *IRE1 $\alpha$*  compared to DMSO-treated fibroblasts (Figure 3A). *BiP/GRP78* expression remained stable, as expected for a target of the three UPR branches. Moreover, *BLOS1* mRNA reached expression level comparable to DMSO-treated fibroblasts, confirming the efficiency of the 4 $\mu$ 8c treatment as an IRE1 $\alpha$  RNase inhibitor. Importantly, *SMN* mRNA expression enhancement following UPR induction in SMA fibroblasts was abolished by IRE1 $\alpha$  inhibition, including full-length and  $\Delta$ 7 *SMN* transcripts (Figure 3B, C). All these data were confirmed at the protein levels, with the return of XBP1s and SMN expression to pathological levels after IRE1 $\alpha$  RNase inhibition (Figure 3D). Since 4 $\mu$ 8c inhibits RNase catalytic domain of IRE1 $\alpha$  without interfering with its kinase activity, no difference was recorded in IRE1 $\alpha$  phosphorylation after 4 $\mu$ 8c treatment [39].

Thus, reactivating IRE1 $\alpha$ -XBP1 branch of UPR in SMA cells induces an upregulation of SMN expression that is specifically dependent on IRE1 $\alpha$  RNase activity.

### **XBP1s is a transcriptional regulator of *SMN2* gene.**

To investigate whether *SMN* expression could be regulated by XBP1s, we transfected SMA fibroblasts with a plasmid encoding XBP1s fused with a Flag tag [33]. XBP1s overexpression significantly enhances *SMN* expression both at mRNA (Figure 3F, G) and protein levels (Figure 3H).

Additionally, RT-qPCR experiments revealed the same increase of both *SMN* full-length and  $\Delta 7$  *SMN* transcripts, suggesting therefore that XBP1s promoted steady state levels of *SMN* transcripts and not exon-7 splicing (Figure 3F, G). Moreover, XBP1s overexpression in SMA fibroblasts significantly increased BiP/GRP78 expression, as expected for an XBP1s gene target.

XBP1s is a transcription factor that preferentially binds CRE-like sequences containing an ACGT core in target gene promoter [40, 41]. We previously reported a CRE sequence in human *SMN* promoter (GenBank accession AF187725), in the first exon of *SMN* (+244 to +248 bp) [30]. This site, which can be also bind by CREB protein, is considered as a crucial positive regulator of *SMN* gene expression [30]. Therefore, we investigated whether XBP1s could bind this site and performed ChIP experiments in SMA fibroblasts overexpressing Flag-XBP1s using Flag antibody. We found that XBP1s bound *SMN* promoter, as well as *BiP/GRP78* promoter used as positive control (Figure 3I, J).

These data highlight an unanticipated role of XBP1s in directly activating *SMN2* gene expression in SMA cells and strongly suggest that enhancing XBP1s expression could be beneficial for SMA.

### **NMDA receptor activation limits the SMA-induced alteration of the IRE1 $\alpha$ /XBP1 branch in the mouse spinal cord.**

These results prompted us to investigate the activation status of the IRE1 $\alpha$ /XBP1 pathway in the spinal cord of control and severe SMA-like mice, with or without NMDA-receptor activation, since this treatment also increases *SMN* expression [15] and activates the UPR [16]. We first analyzed the expression levels of the main effectors of the pathway, at RNA and protein level in the lumbar spinal cord of severe SMA-like mice at P12, which corresponds to disease end-stage in this mouse model. As shown in Figure 4A, we found that *Irel1 $\alpha$*  mRNA was overexpressed in SMA spinal cord compared to controls, whereas *Xbp1u* and *Xbp1s* mRNAs were significantly downregulated. Moreover, we found a strong increase in phosphorylated IRE1 $\alpha$  (p-IRE1 $\alpha$ ), without increase in total IRE1 $\alpha$  protein (Figure 4B). The significant increase in the ratio p-IRE1 $\alpha$ /IRE1 $\alpha$  in SMA compared to controls, strongly suggests that IRE1 $\alpha$  was overactivated in SMA, as previously reported in another SMA mouse model [23]. As found in human SMA cells, despite IRE1 $\alpha$  overactivation, XBP1s protein levels were significantly decreased (Figure 4C) as the BiP/GRP78 protein. This result concurred with the decrease XBP1s targets *BiP/GRP78*, *Pdia4* and *Pdia6* mRNA expression in SMA spinal cord compared to controls (Figure 4A).

Interestingly, NMDA-receptor activation rebalanced the expression of IRE1 $\alpha$ /XBP1 pathway components, including the up-regulation of XBP1s and BiP/GRP78 and the downregulation of IRE1 $\alpha$ , leading to a pattern comparable to controls (Figure 4).

Again, *Chop* and *Blos1* expression levels remained unchanged in mouse SMA spinal cord with or without NMDA-receptor activation, suggesting an unlikely activation of IRE $\alpha$ -dependent apoptotic pathways, including RIDD (Figure 4A).

These suggest that, in the spinal cord of severe SMA-like mice, as in SMA patient cells, IRE1 $\alpha$  although overactivated is unable to trigger pro-survival UPR cascade, and notably *Xbp1* splicing, leading to XBP1s depletion.

### **Alterations of the IRE1 $\alpha$ /XBP1 pathway precedes massive MN death in severe SMA-like mice.**

To determine whether IRE1 $\alpha$ /XBP1 branch alteration, notably the depletion of XBP1s, precedes or is a consequence of SMA-induced MN death, we investigated protein expression levels and the activation status of IRE1 $\alpha$ /XBP1 pathway in the lumbar spinal cord of severe SMA-like mice aged 4 (P4) and 8 (P8) days corresponding to pre-symptomatic and early symptomatic phases of the disease respectively, before the massive death of spinal MN [26, 42]. Very interestingly, at P4, XBP1s expression displayed a significant downregulation in SMA spinal cord compared to controls, in absence of any other molecular alteration of the pathway (Figure 5A, B). Later on, at P8, XBP1s protein levels remained significantly decreased in SMA spinal cord compared to controls. Moreover, at this age, the other main components of the IRE1 $\alpha$ /XBP1 pathway *i.e.* BiP/GRP78, IRE1 $\alpha$  and p-IRE1 $\alpha$  proteins displayed a significant decrease in their protein expression (Figure 5C, D). Interestingly, the ratio of p-IRE1 $\alpha$ /total IRE1 $\alpha$ , remained unchanged when compared to controls, suggesting that defects in the IRE1 $\alpha$ /XBP1 pathway precedes IRE1 $\alpha$  overactivation in SMA spinal cord as previously seen in SMA hiPSC.

We extended our analysis to the lumbar spinal cord of other mouse models of SMA, including very severe SMA-like mice [27], in which a massive MN death occurs at birth, and the mild-type SMA-

like mice [43], in which MN death is milder and progressive, compared to the former. Interestingly, the same expression defects in IRE1 $\alpha$ /XBP1 pathway as those found in severe SMA-like mice aged of 12 days could be observed in the spinal cord of very severe SMA-like mice at 2 days of age, including XBP1s and BiP/GRP78 expression downregulation and IRE1 $\alpha$  activation (Figure S3A). By contrast, no alteration of the IRE1 $\alpha$ /XBP1 pathway could be found in the spinal cord of mild-type SMA-like mice (Figure S3B).

These data show that IRE1 $\alpha$ /XBP1 pathway alteration, notably the decrease in XBP1s expression, is associated to, and even precedes, MN death in severe types of SMA-like mice, suggesting that IRE1 $\alpha$ /XBP1 alterations participate in SMA pathogenesis.

### ***In vitro* SMN depletion in murine MN-like cells recapitulates the IRE1 $\alpha$ /XBP1s alterations found *in vivo*.**

We next investigate whether IRE1 $\alpha$ /XBP1s impairments found in SMA could be a direct consequence of SMN depletion. We used the murine Motor-Neuron-1-like (MN-1) cell line and depleted about SMN about 75. %. This induced significant IRE1 $\alpha$  overactivation (Figure 5E) associated with a significant decrease in XBP1s expression, at mRNA and protein levels (Figure S4; and Figure 5E). XBP1s expression decrease was associated with a significant decrease in its target BiP/GRP78, but only at the protein levels.

Thus, SMN depletion in MN-1 cells was sufficient to compromise the IRE1 $\alpha$ /XBP1 pathway, with, notably, an induced XBP1s depletion and IRE1 $\alpha$  overactivation.

### **Enhancement of XBP1s levels by pharmacologic ATF6-activating molecules promoted SMN expression.**

Since XBP1s could induce *SMN* expression in SMA cells, we reasoned that activating ATF6 pathway in SMA cells should activate *XBP1u* transcription, providing enough substrates to IRE1 $\alpha$ , to produce *XBP1s* [20]. We treated SMA fibroblasts with AA147, a specific ATF6 activator shown to promote protective remodeling of UPR system including the IRE1 $\alpha$ /XBP1 pathway [41]. AA147 treatment was sufficient to significantly increase *XBP1u* mRNAs levels (Figure 6A) and as anticipated, *XBP1s* and its gene target *BiP/GRP78* mRNA expression levels and also in *CHOP* mRNA expression. We found that only the exon-7 containing *SMN* transcripts displayed a significant enhancement following AA147 treatment, without change in the total amount of *SMN* transcripts (Figure 6B, C).

Therefore, we investigated AA147 treatment effect *in vivo*, in the spinal cord of severe SMA-like mice. Severe SMA-like mice were treated daily from P7 to P10 by intrathecal injection of AA147. As expected, this treatment increased *Xbp1u* mRNA expression in the spinal cord of severe SMA-like mice compared to controls, indicating ATF6 activation (Figure 6D). This activation was sufficient to re-activate the IRE1 $\alpha$ /XBP1 pathway since *Xbp1s* and *Bip/Grp78* mRNA levels were also increased. Interestingly, *Chop* mRNA was not increased after AA147 injection, suggesting no induction of apoptosis. Nevertheless, and consistent with the *in vitro* data, *in vivo* ATF6 activation resulted in a significant increase in exon-7 containing *SMN* transcripts (E7-E8), without increasing the amount of total *SMN* mRNA (E2a-E2b) (Figure 6E), showing that AA147 induced SMN exon-7 inclusion (Figure 6F). These results were confirmed at the protein level, in the spinal cord of AA147-treated compared to vehicle-treated severe SMA-like mice (Figure 6G, H). These changes in gene expression occurred without alteration in IRE1 $\alpha$  expression and activation (Figure 6G).

Altogether, these results show that ATF6 activation, directly in mouse SMA spinal cord, can enhance SMN expression, raising important questions on the neuroprotective potential of ATF6 pathway in SMA.

### **Pharmacologic ATF6 activation limits MN loss and improves the motor behavior of severe SMA-like mice.**

To determine whether ATF6-dependent SMN up-regulation could be associated with SMA spinal MN protection, we compared the number of ChAT-positive MNs in the ventral spinal cord of control mice and vehicle- or AA147-treated severe SMA-like mice at P10 (Figure 7A, B). We observed 20% MN loss in the vehicle-treated severe SMA-like mice in comparison to controls. Interestingly, after AA147 treatment, the number of spinal MNs was no longer different from healthy controls. Thus, ATF6 activation exerted a neuroprotection at the levels of the MNs.

We next questioned whether this neuroprotection following AA147 treatment would improve the motor behavior of severe SMA-like mice. We first subjected the mice to a grip test and found that AA147 treatment significantly increased the grip time of severe SMA-like mice at P10 (Figure 7C). We then analyzed the mouse spontaneous activity in an open field (Figure 7D, E). Compared to vehicle-treated severe SMA-like mice, severe SMA-like mice treated with AA147 showed a progressive and continuous increase in their exploration activity, with a total number of crossings that doubles from P8 to P11, including more exploration at the edges of the field.

We next looked at the body weight curves of mice. While the severe SMA-like mice expectedly displayed a severe body weight reduction from P8 until death that occurred around 10 days of age, the AA147-treated severe SMA-like mice maintained their weight until death (Figure 7F).

Finally, we found that 30% of AA157 treated mice survived longer than the 10 days-mean lifespan of the vehicle-treated severe SMA like-mice (Figure 7G).

Taken together, these data demonstrate that *in vivo* ATF6 activation significantly limited the extent of SMA-induced MN death, associated with the improvement of the motor behavior of severe SMA-like mice.

## DISCUSSION

This study shows that the depletion in active XBP1, independent of the activation status of its inducer IRE1 $\alpha$ , participates in SMA-induced neurodegeneration. This effect likely occurs through the lack of XBP1s-mediated enhancement of SMN expression. XBP1s depletion, which likely precedes IRE1 $\alpha$  overactivation, can be rescued by ATF6 induction *in vivo*, leading to MN protection and significant improvements of SMA symptoms in mice.

One key finding is that XBP1s depletion in SMA worsens *SMN* defect. Indeed, *SMN* genes are transcriptional targets of XBP1s, as evidenced by both the enhancement in SMN expression following XBP1s overexpression in SMA cells and XBP1s ability to bind *SMN2* promoter (Figure 3). The role of XBP1s as a transcriptional activator of genes with unknown link to ER stress such as those involved in cell differentiation has already been reported.

Interestingly, XBP1s may contribute to the promotion of exon-7 inclusion in *SMN* transcripts generated by *SMN2* transcription, as observed following ATF6 activation by AA147 or global UPR activation by thapsigargin. However, this event was not observed when XBP1s alone was overexpressed. Therefore, other UPR branches, such as ATF6, are needed for regulating *SMN2* splicing. Interestingly, IRE1 $\alpha$  and ATF6 have been already shown to act in synergy for controlling gene expression [44, 45].

In SMA, in which the accumulation of unfolded proteins has never been evidenced, the SMA-induced XBP1s depletion is a likely explanation for IRE1 $\alpha$  overactivation. The earliest event of the pathway alteration found in SMA patient hiPSC-derived MNs was XBP1s expression decrease after 14 days of differentiation, thus before the massive MN death that begins at day 18 (Figure S1). In line with these results, XBP1s decrease was the unique alteration seen in the spinal cord of severe SMA-like mice at P4 (Figure 5). Alteration in IRE1 $\alpha$  activation could be detected in a later time during SMA progression. Thus, in all the severe SMA models we used, which include hiPCS-derived MNs, human myobubes and fibroblasts, SMN-depleted murine MN-like cells and two different severe type SMA-like mouse strains, XBP1s was depleted, irrespective of IRE1 $\alpha$  activation pattern. Accordingly, XBP1s depletion in  $\beta$ -cells is sufficient to cause constitutive overactivation of IRE1 $\alpha$  and impairments in ER stress response [46].

Why SMN deficiency can result in XBP1s depletion remains to be elucidated. *XBP1s* mRNA maturation highly depends on the ribosome trafficking inside the cytosol, its anchoring to membrane and on local translation, processes known to be severely altered in SMA. Furthermore, XBP1s depletion at the protein level could arise in addition, from defective SMN dependent priming of ribosomes [47].

In apparent contrast with the present data, Ng and colleagues reported that *XBP1s* mRNA is overexpressed in SMA MNs derived from hiPSCs [23]. However, these data were not confirmed in the SMA mouse model they used [23] nor in a following study using deep RNA sequencing in MNs derived from hiPSC [24]. Importantly, we provide here the first results on UPR at the protein level in hiPSC-derived MNs, allowing us to compare IRE1 $\alpha$  activation pattern, on the one hand, and XBP1s expression, on the other. These results unquestionably revealed the defect in XBP1s expression. Noteworthy, SMN

expression rescue in hiPSC-derived MNs resulted in XBP1s rebalancing, consistently revealing that XBP1s decrease is dependent on SMN expression. Nevertheless, these contrasting results may illustrate differential adaptations of the UPR system with respect to the cellular context, as it has been demonstrated in dopaminergic neurons of the brain [48]. Here, we used two cultures (control vs SMA) with a familial link (Mother and child) and we found XBP1s decreased in the SMA samples, suggesting that IRE1 $\alpha$ /XBP1 alterations in SMA is unlikely due to the genetic diversity in the general population.

As a proof of concept that rebalancing UPR in SMA spinal cord could promote MN survival, we report that severe SMA-like mice treated with AA147 showed an increase in XBP1s and its target BiP/GRP78 expression, along with spinal MN protection and motor behavior improvement. Importantly, all these benefits are associated with an increase in SMN expression.

Ng and colleagues have indicated that guanabenz, an inhibitor of general translation [49, 50], lessens apoptosis in SMA mouse spinal cord [23]. Actually, Guanabenz inhibits the dephosphorylation of eIF2 $\alpha$  [49]. The enhancement of eIF2 $\alpha$  phosphorylation inhibits general translation but also increases ATF4 translation [51]. Interestingly, guanabenz has been previously shown to induce neuroprotection through ATF4 activation in a cellular model of Parkinson's disease [51]. Moreover, PERK/ATF4 pathway activation has been shown connected with other UPR branches, notably the IRE1 $\alpha$ /XBP1 pathway. Yet, PERK/ATF4 pathway activation can stimulate IRE1 $\alpha$  expression [52] and stabilize XBP1s mRNA [53], both events leading to an increase in XBP1s expression. Finally, the results from Ng and colleagues [23] and the present results concur for considering the IRE1 $\alpha$ /XBP1 branch of the UPR as an important pathway in SMA pathogenesis, which re-activation could result in neuroprotective effects for SMA MNs.

We provide evidences that compromised UPR is involved in SMA pathogenesis, with a direct impact on SMN expression in SMA cells and tissues, and strongly suggests that rebalancing UPR should be considered when developing pharmacological therapies that aimed at alleviating SMA symptoms in patients.

## MATERIAL & METHODS

See Supporting Information for detailed descriptions.

### hiPSC-derived motor neurons

hiPSC were generated by reprogramming Coriell Biorepository patient fibroblasts as previously described [25]. 2 independent control hiPSC and 2 SMA hiPSC were generated from fibroblast lines (Figure S1). An isogenic control SMA line was obtained from one SMA hiPSC line in which a plasmid encoding SMN (pEF1aFlagbiotagSMN-PGKpuro, kindly gift of H. Wichterle and S. Nedelec) was stably transfected (RESCUE). Informed consents were obtained from all the patients included in this study, complying with the ethical guidelines of the institutions and with the legislation requirements of the country of origin. Experimental protocols were approved by the French Ministry of health: A02599-48. For spinal MNs differentiation from hiPSCs, we used a previously reported protocol [25].

### Mice, treatment and behavior analysis.

SMA mouse model were previously described [15, 26, 27]. NMDA (Sigma-Aldrich) treatment was performed as described [15] and AA147 (Sigma-Aldrich) was injected intrathecally on P7 neonatal control and severe SMA-like mice. Grip strength and the ambulatory behavior was assessed as described [15].

The care and treatment of animals followed the national authority (French Ministry of Research and Technology) guidelines for the detention, use, and ethical treatment of laboratory animals.

### Western blot analysis.

Western blot was performed as described previously [28, 29]. antibodies are described in supporting information.

### RT-qPCR analysis.

RT-qPCR was performed as described [30]. Relative mRNA amounts were quantified using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$

method [31].

### **Immunofluorescence analysis.**

Immunofluorescence on hiPSC and motor neuron was performed as described previously [15, 25, 29].

### **Cell culture and plasmid transfection.**

Human immortalized culture of fibroblasts from type I SMA patients [32] were transfected with a plasmid coding for XBP1s fused to a flag (pCMV5-Flag-XBP1s). pCMV5-Flag-XBP1s was a gift from Qingbo Xu & Lingfang Zeng (Addgene plasmid # 63680; <http://n2t.net/addgene:63680>; RRID:Addgene\_63680) [33]. SMA and WT human primary cultures of myoblasts were cultivated as described previously [30, 35]. MN-1 [34] cells were transfected with siRNA (Dharmacon) following the manufacturer's instructions.

### **Chromatin Immunoprecipitation (ChIP).**

SMA fibroblasts were transfected for 48h with pFlag-CMV2-empty vector or pCMV5-Flag-XBP1s. Chromatin was extracted and DNA was fragmented. After Flag Immunoprecipitation, bound DNAs were analysed by qPCR.

### **Statistical Analysis.**

All data are expressed as means with standard deviation ( $\pm$  SD) of n different cultured cell samples or mice for each group. Grubbs test were performed to remove potential outliers.

For endpoint studies, a Kolmogorov–Smirnov normal distribution analysis was performed followed by the appropriate statistical test indicated in the figure legends (Prism 7, GraphPad Software, Inc).

### **Experimental Design.**

All experiments based on mice were performed blinded, with samples vials uniquely coded to replace pathological or control origins. The pathological background of the mice was further determined by both physiological criteria (body weight, size, and tail length) and post-dissection genotyping.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors wish to thank Claire Mader and her team (Animal facility, BioMedTech Facilities, CNRS UMS 2009, INSERM US 36) for taking care of all the mice used in this study, S. Lefebvre for the kind gift of immortalized fibroblasts, J. Côté (University of Ottawa, Canada) for the kind gift MN-1 cells and S. Nedelec for the kind gift pEF1aFlagbiotagSMN-PGKpuro. We also thank the *Cyto2BM Molecular Biology Platform* of BioMedTech Facilities. C.B. is the recipient of a CIFRE fellowship with Biophytis company.

### **Ethics approval**

For human Ipsc, Experimental protocols were approved by the French Ministry of health: A02599-48. The care and treatment of animals followed the national authority (French Ministry of Research and Technology) guidelines for the detention, use, and ethical treatment of laboratory animals.

### **Conflict of interest**

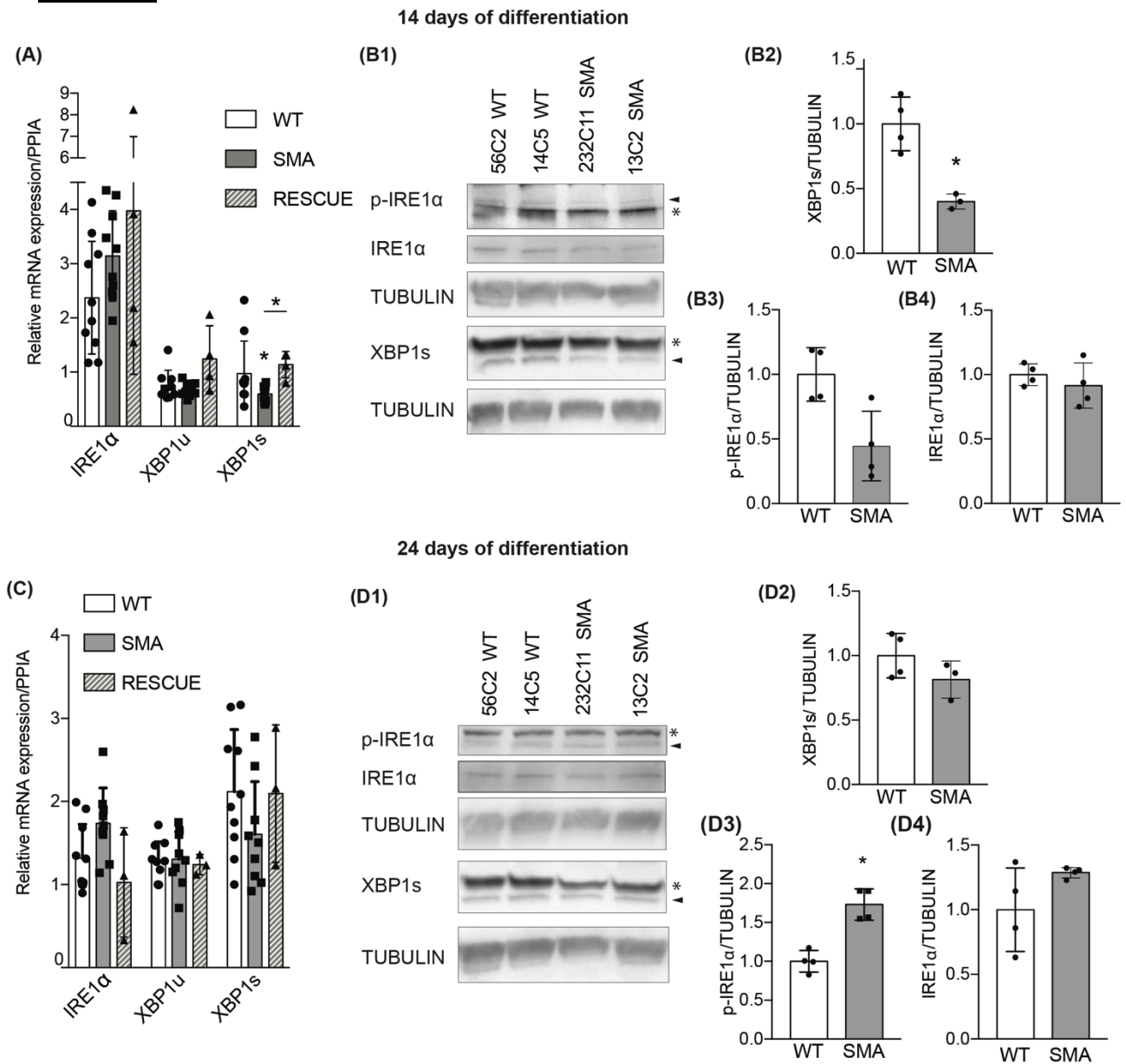
The authors declare that they have no competing interests.

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

DD designed and performed experiments, analyzed data and wrote the manuscript. OB, designed and analyzed the IF data and ZC contributed to MN quantification. CJ, CM and LW produced and contributed to the analysis of hiPSC-derived MNs. CB, MEK and LH contributed to mouse experiments. DS contributed to RT-qPCR experiments. BDG contributed with expert advice and input on design and analysis in cloning. ChM and TJ contributed to the molecular analysis design. VKS contributed to the data analysis and to the writing of the manuscript. FC conceptualized the project and LW and FC designed the overall research, analyzed the data, and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

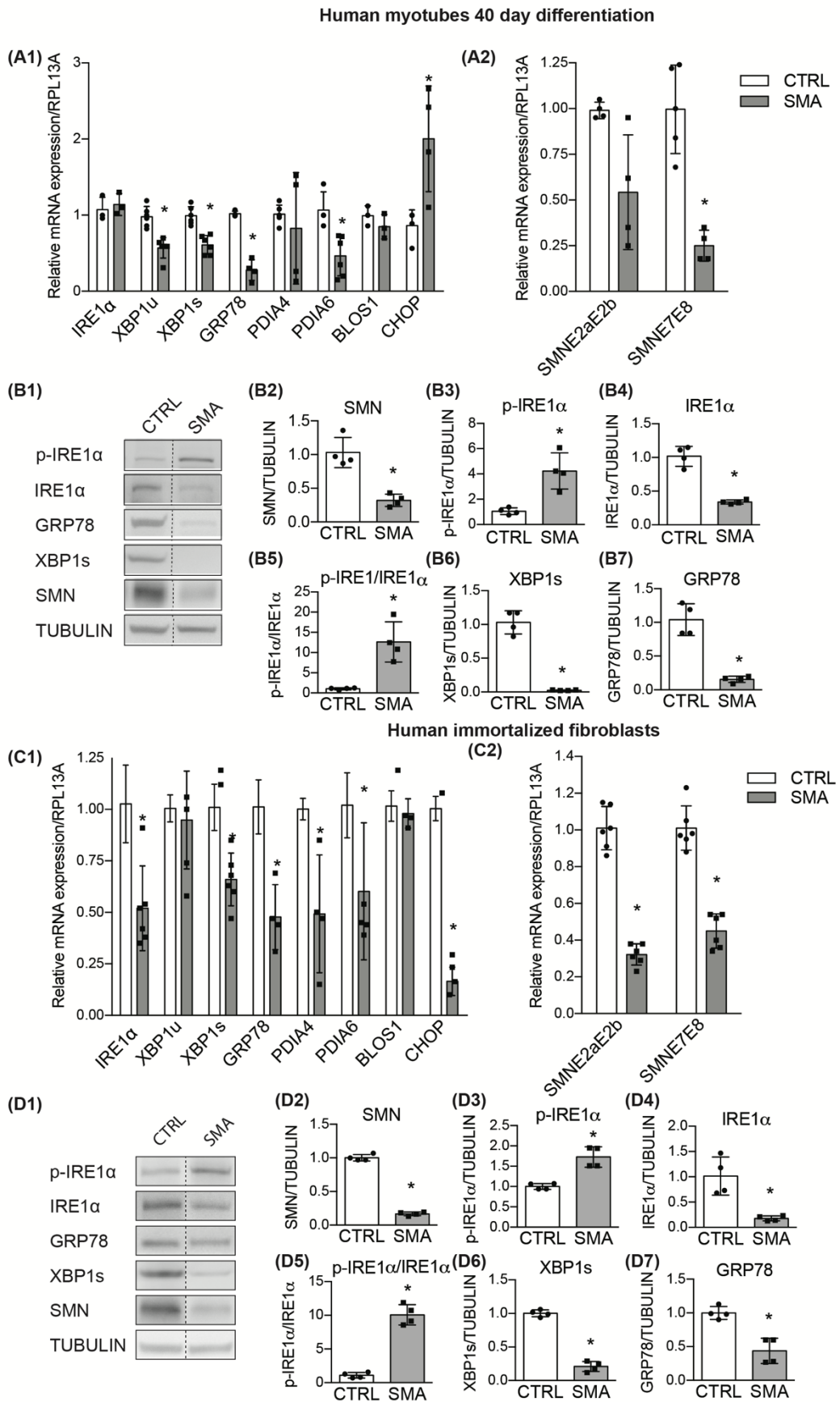


**FIGURE 1**



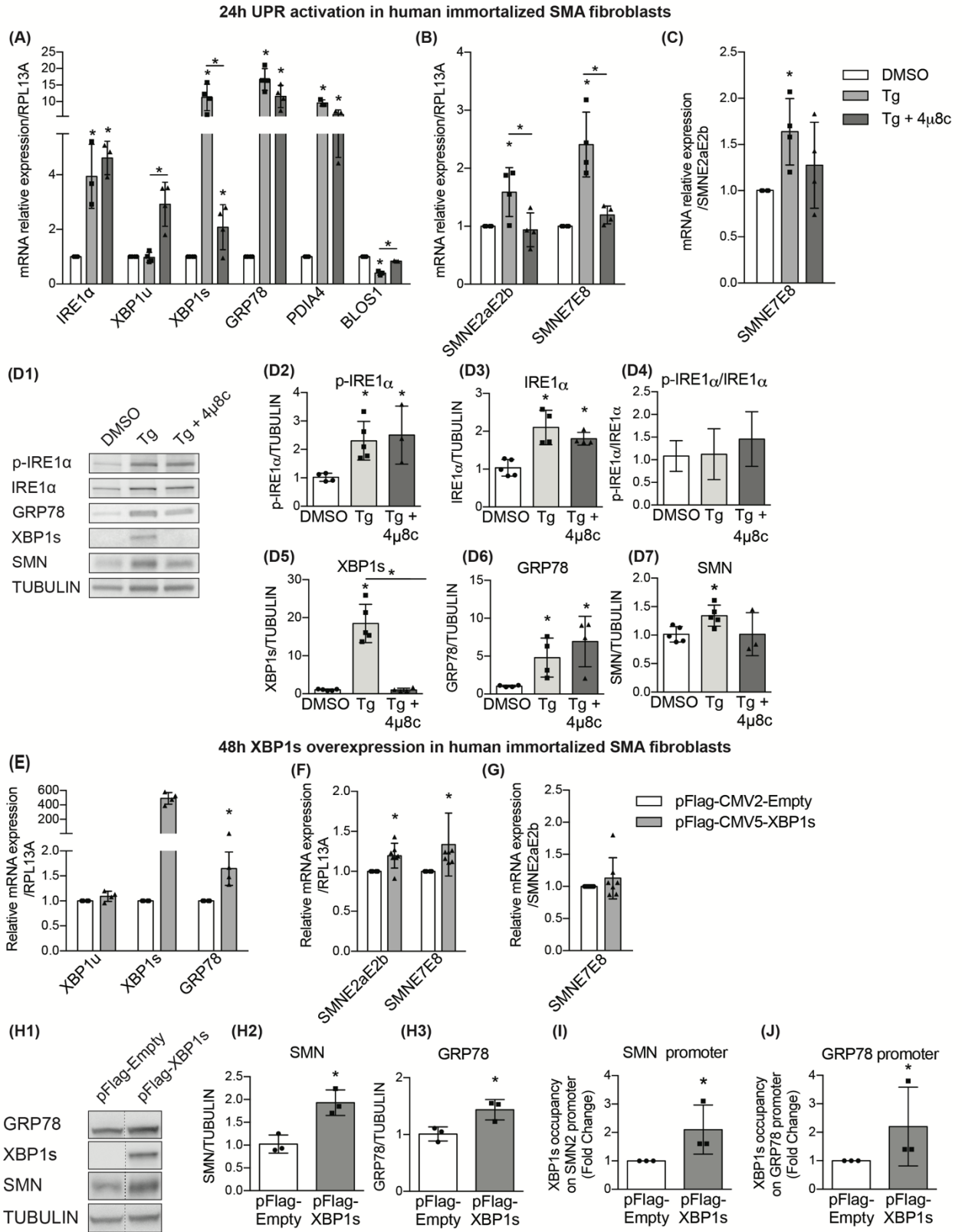
**FIGURE 1:** Differentiated MNs from SMA hiPSCs show a defect in XBP1 splicing. (A, C) Quantification by RT-qPCR of *IRE1α*, *XBP1u* and *XBP1s*, mRNAs normalized to *PPIA* transcript in differentiated MNs, at Day 14 (d14) (A) and Day 24 (d24) (C) from WT, SMA and RESCUE cell line hiPSCs. (n=2 wt and SMA and n= 5 technical replicates). (B, D) Quantification by western blot of p-IRE1α, *IRE1α* and *XBP1s*, in differentiated MNs, at d14 (B) and d24 (D) (n=2 WT and SMA and n=3 technical replicates). Data are expressed as mean ± SD, \*  $P < 0.05$ , T-test Post Hoc Mann-Whitney Test.

**FIGURE 2**



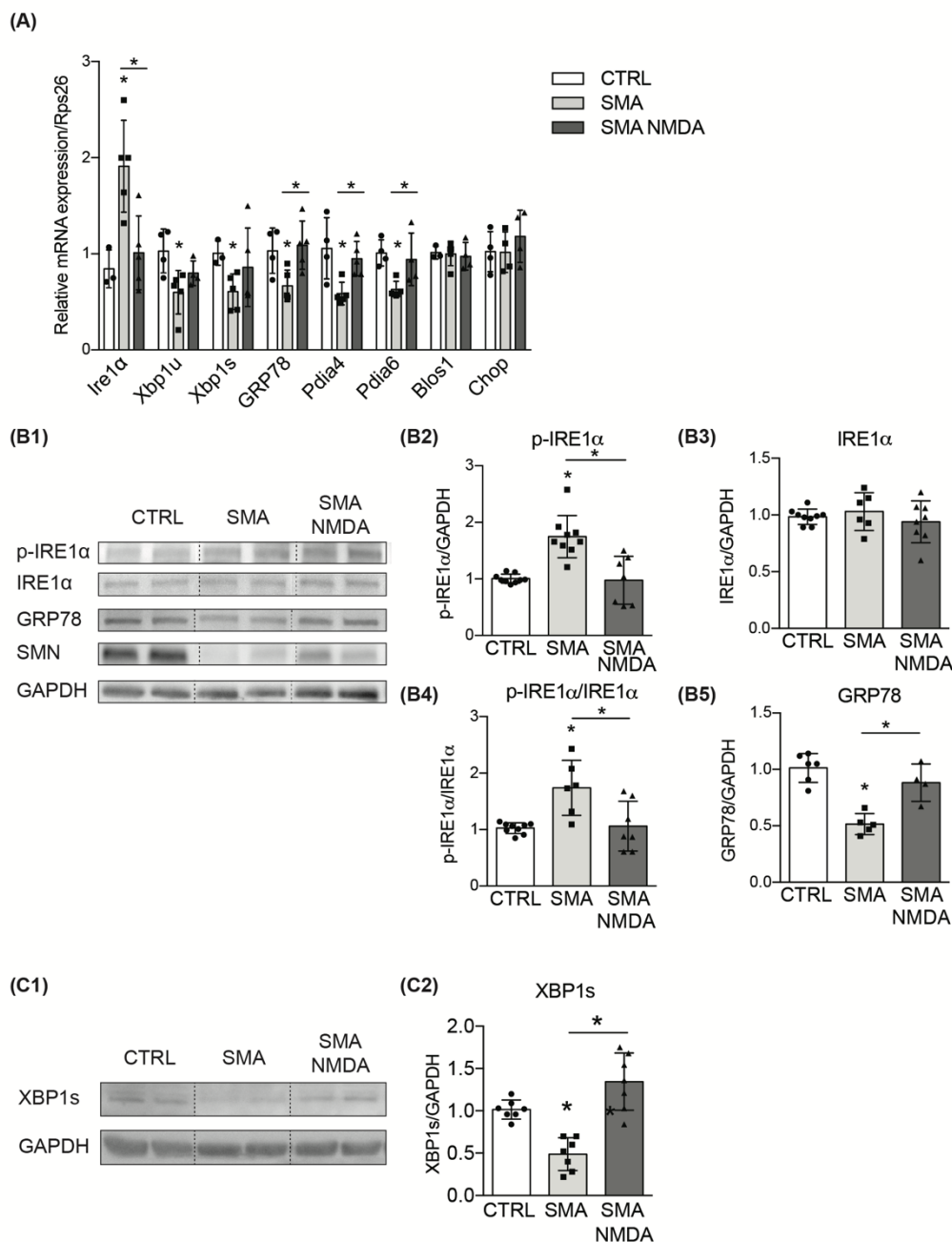
**FIGURE 2:** IRE1 $\alpha$ /XBP1s pathway is altered in human SMA patient-derived myotubes and fibroblasts. (A) Quantification by RT-qPCR of *IRE1 $\alpha$* , *XBP1u*, *XBP1s*, *BiP/GRP78*, *PDIA4*, *PDIA6*, *BLOS1*, *CHOP* (left) total *SMN* – exon 2a- exon 2b (*SMNE2aE2b*) and *SMN*-containing exon 7, exon 7- exon 8 (*SMNE7E8*) mRNAs (right) normalized to *RPL13A* transcript in SMA type II patient-derived myotubes after 40 days of differentiation (n=4). (B) Western blot analysis and quantification of p-IRE1 $\alpha$ , IRE1 $\alpha$ , XBP1s, SMN and BiP/GRP78 protein expression in SMA type II patient-derived myotubes after 40 days of differentiation (n=4). (C) Quantification by RT-qPCR of *IRE1 $\alpha$* , *XBP1u*, *XBP1s*, *BiP/GRP78*, *PDIA4*, *PDIA6*, *BLOS1*, *CHOP* (left) and *SMNE2aE2b*, *SMNE7E8* mRNAs (right) normalized to *RPL13A* transcript in SMA type I patient-derived immortalized fibroblasts (n=4). (D) Western blot analysis and quantification of p-IRE1 $\alpha$ , IRE1 $\alpha$ , XBP1s, SMN and BiP/GRP78 proteins expression in SMA type I patient-derived immortalized fibroblasts (n=4). Vertical dotted lines indicate that the pictures have been spliced from the same blot. Data are expressed as mean  $\pm$  SD \*p<0.05 T-test Post Hoc Mann-Whitney Test.

**FIGURE 3**

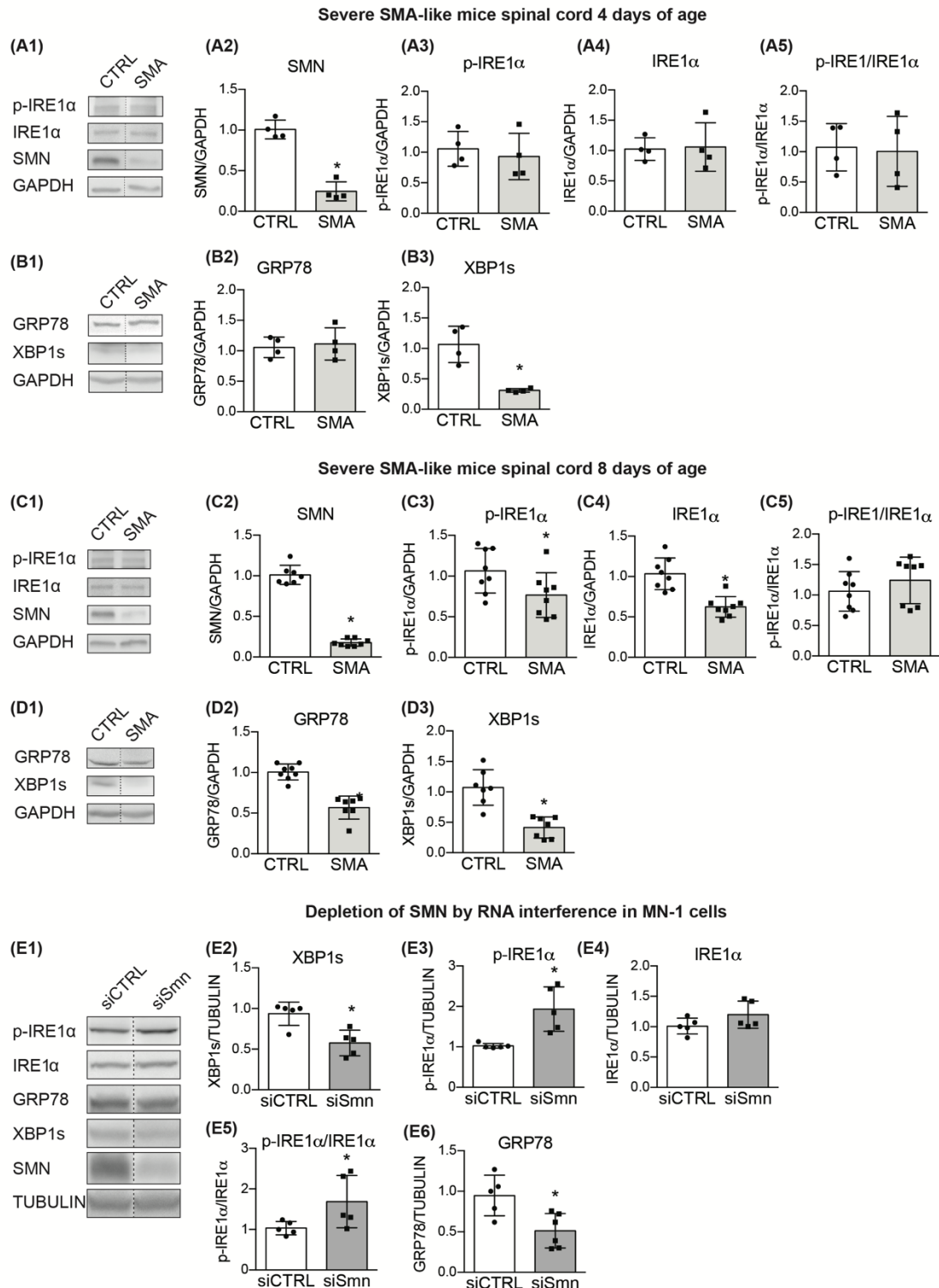


**FIGURE 3:** UPR stimulation increases SMN expression levels through the activation of IRE1 $\alpha$ /XBP1s pathway. (A, B) Quantification by RT-qPCR of *IRE1 $\alpha$* , *XBP1u*, *XBP1s*, *BiP/GRP78*, *PDIA4* and *BLOS1* (A) and *SMNE2aE2b* and *SMNE7E8* mRNAs (B) normalized to *RPL13A* transcript (n=4) in SMA type I patient-derived immortalized fibroblasts treated with DMSO or 0.5  $\mu$ M Thapsigargin (Tg-UPR inducer) with or without 4 $\mu$ 8c (IRE1 Rnase activity inhibitor) for 24h. (C) Level of exon-7 inclusion in *SMN* transcript quantified by RT-qPCR of *SMNE7E8* mRNAs normalized to *SMNE2aE2b* (n=4) in SMA type I patient-derived immortalized fibroblasts treated with DMSO or 0.5  $\mu$ M Tg with or without 4 $\mu$ 8c for 24h. **D** Western blot analysis and quantification of p-IRE1 $\alpha$ , IRE1 $\alpha$ , XBP1s, BiP/GRP78 and SMN proteins (n=4) in SMA type I patient-derived immortalized fibroblasts treated with DMSO or 0.5  $\mu$ M Tg with or without 4 $\mu$ 8c for 24h. \*p<0.05. One-way ANOVA Post Hoc Tukey Test. (E, F) Quantification by RT-qPCR of *XBP1u*, *XBP1s*, *BiP/GRP78* (E) and *SMNE2aE2b* or *SMNE7E8* (F) mRNAs normalized to *RPL13A* transcript in SMA type I patient-derived immortalized fibroblasts transfected 48h with pCMV5-Flag-XBP1s or empty vector pFlag-CMV2 (n=6). (G) Quantification by RT-qPCR of *SMNE7E8* mRNAs normalized to *SMNE2aE2b* (n=6) in SMA type I patient-derived immortalized fibroblasts transfected 48h with pCMV5-Flag-XBP1s or empty vector pFlag-CMV2. (H) Western blot analysis and quantification of SMN and BiP/GRP78 protein expression in SMA type I patient-derived immortalized fibroblasts transfected 48h with pCMV5-Flag-XBP1s 0.5  $\mu$ g or vector pFlag-CMV2-Empty (n=3). \*p<0.05. T-test Post Hoc Mann-Whitney Test. (I, J) qPCR performed to detect *SMN2* (I) and *BiP/GRP78* (J) promoters following Chip against Flag-XBP1s in SMA type I patient-derived immortalized fibroblasts transfected 48h with 0.5  $\mu$ g of pCMV5-Flag-XBP1s or pFlag-CMV2-empty vectors (n=3). Data are expressed as mean  $\pm$  SD \*p<0.05. T-test Post Hoc Mann-Whitney Test. Vertical dotted lines indicate that the pictures have been spliced from the same blot.

**FIGURE 4**

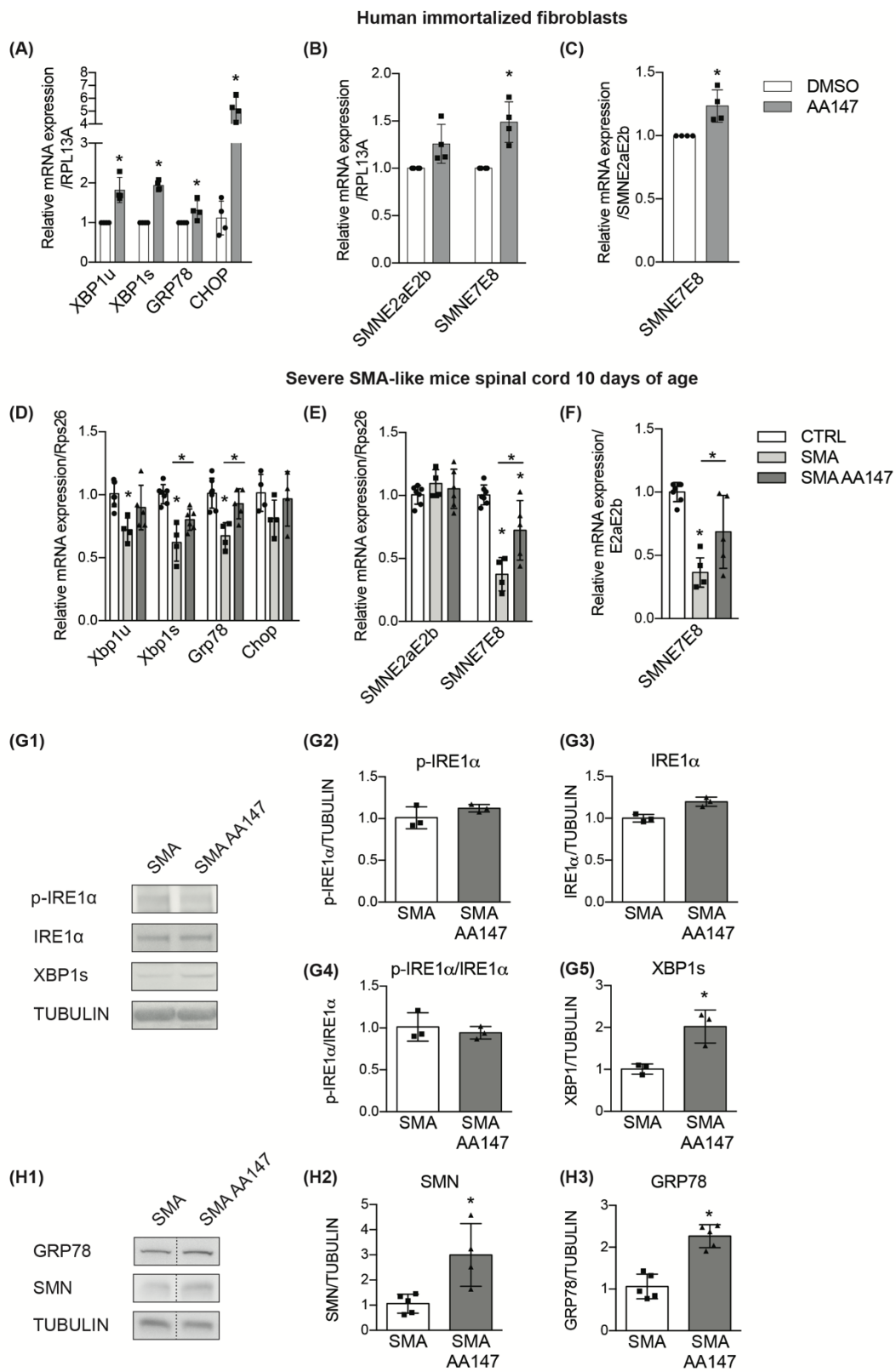


**FIGURE 4:** NMDA receptor activation limits IRE1α/XBP1s pathway alterations in severe SMA-like mice lumbar spinal cord. (A) Quantification by RT-qPCR of *Ire1α*, *Xbp1u*, *Xbp1s*, *Grp78*, *PDIA4* and *6*, *Blos1* and *Chop* mRNAs normalized to *Rps26* in the spinal cord of vehicle-treated control mice and vehicle- or NMDA-treated severe SMA-like mice at 12 days of age (n=4). (B, C) Western blot analysis and expression quantification of p-IRE1α, IRE1α, BiP/GRP78, SMN (B) and XBP1s (C) proteins in the spinal cord of vehicle-treated control mice and NMDA- or vehicle-treated severe SMA-like mice at 12 days of age (n=6). Data are expressed as mean ± SD \*p<0.05. One-way ANOVA Post Hoc Tukey Test. Vertical dotted lines indicate that the pictures have been spliced from the same blot.

**FIGURE 5**

**FIGURE 5:** XBP1s diminution is an early event in severe SMA-like mice and is linked to SMN depletion. (A-D) Western blot analysis and quantification of SMN, p-IRE1 $\alpha$ , IRE1 $\alpha$  (A,C) and XBP1s, BiP/GRP78 (B, D) protein expression in the lumbar spinal cord of control and severe SMA-like mice at 4 days of age (n=4) (A, B) at 8 days of age (n=4) (C, D). (E) Western blot analysis and expression quantification of SMN, p-IRE1 $\alpha$ , IRE1 $\alpha$ , XBP1s and BiP/GRP78 proteins in MN-1 cell culture transiently transfected for 48h with either a nonrelevant siRNA (siCTRL) or a siRNA against murine *Snm* (siSnm) (n=6). Data are expressed as mean  $\pm$  SD. \*p<0.05. T-test Post Hoc Whitney Test. Vertical dotted lines indicate that the pictures have been spliced from the same blot.

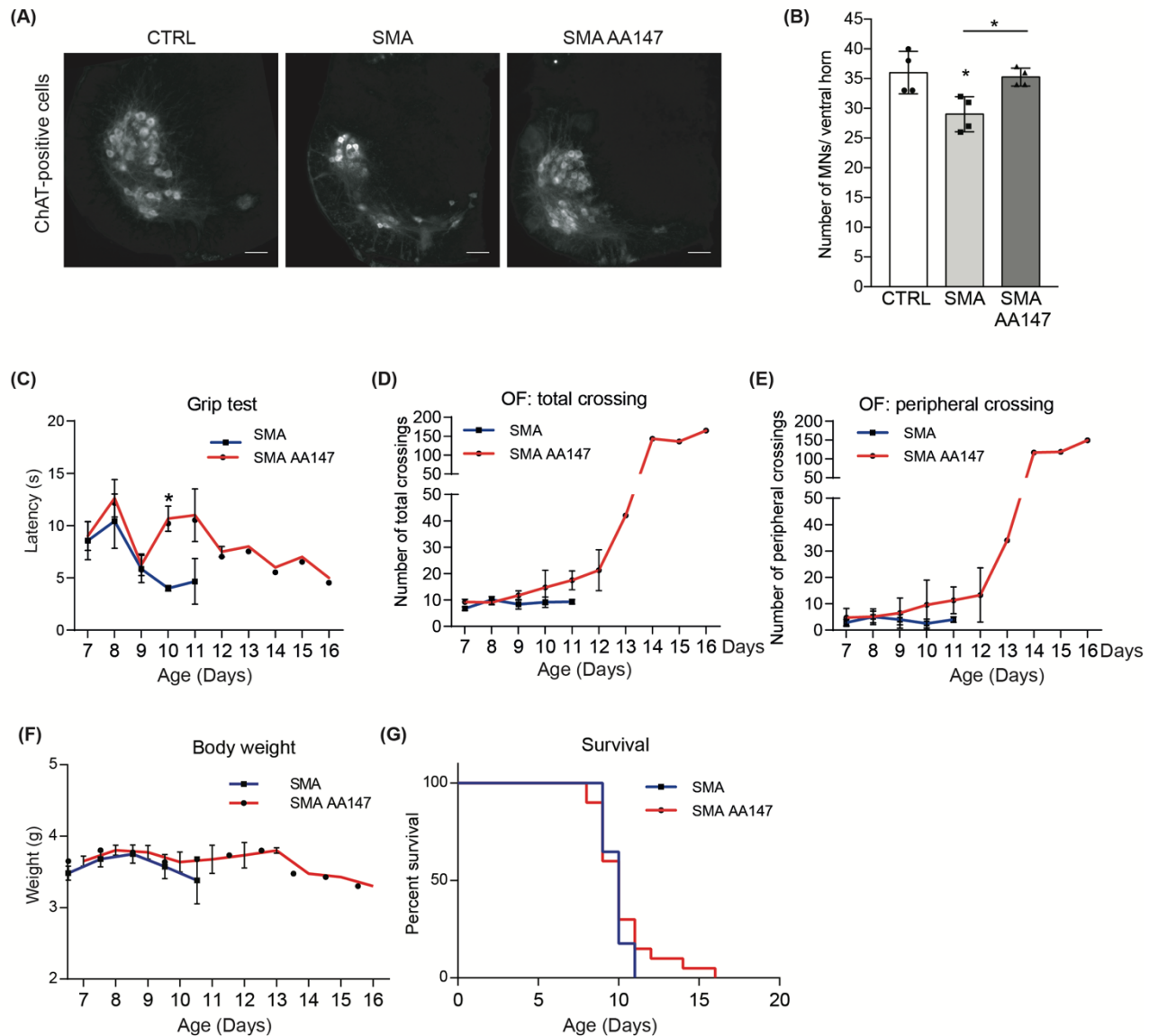
**FIGURE 6**





**FIGURE 6:** ATF6-activating molecule AA147 enhances SMN expression in both *in vitro* and *in vivo* models of SMA. (A-C) SMA type I patient-derived immortalized fibroblasts were treated with DMSO or 20  $\mu$ M AA147 (ATF6 activator) (n=4) for 24h. Quantification by RT-qPCR of *XBPlu*, *XBPls*, *BiP/GRP78*, *CHOP* and *Htra2- $\beta$ 1* (A) and *SMNE2aE2b* and *SMNE7E8* (B) mRNAs normalized to *RPL13A* transcript and of *SMNE7E8* mRNAs normalized to *SMNE2aE2b* (C). \*p<0.05. T-test Post Hoc Mann-Whitney Test. (D-H) mRNA (n=6) (D-F) and protein (n=5) (G-H) expression analysis in lumbar spinal cord after injection of AA147 or vehicle in control and severe SMA-like mice from P7 to P10. Quantification by RT-qPCR of *Xbp1u*, *Xbp1s*, *Bip/Grp78*, *Chop* and *Tra2b* (D) and *SMNE2aE2b* and *SMNE7E8* (E) normalized to *Rps26* transcript and of *SMNE7E8* mRNAs normalized to *SMNE2aE2b* (F). \*p<0.05. One-way ANOVA Post Hoc Tukey Test. Western blot analysis and quantification of p-IRE1 $\alpha$ , IRE1 $\alpha$ , XBP1 (G, n=3), and SMN and BiP/GRP78 (H, n= 5) protein expression. Data are expressed as mean  $\pm$  SD \*p<0. 05. T-test Post Hoc Mann-Whitney Test.

**FIGURE 7**



**FIGURE 7:** *In vivo* AA147 treatment in severe SMA-like mice promotes spinal MN protection and improves muscle function. (A) Immunodetection of ChAT-positive MNs in the lumbar spinal cord (L1–L5) of vehicle-treated control and SMA mice and AA147-treated severe SMA-like mice at 10 days of age and representative images are shown. Scale bar, 100  $\mu$ m. (B) Quantitative analysis of the number of MNs per ventral horn in the lumbar spinal cord of vehicle-treated control and SMA mice compared with AA147-treated severe SMA-like mice at 10 days of age (n=4). \*p<0.05. One-way ANOVA Post Hoc Tukey Test. (C) Grip time. (D) Total number of crossings during 5 min, (E) Number of peripheral crossings of vehicle-, and AA147-treated severe SMA-like mice (n=7, n=8, respectively). \*p<0.05. T-test Post Hoc Mann-Whitney Test. (F) Weight curve and (G) lifespan in AA147-treated (n=20) compared with vehicle-treated severe SMA-like mice (n=17). Data are expressed as mean  $\pm$  SD.

## REFERENCES

1. Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*. 1995;80:155–65.
2. Crawford TO, Pardo CA. The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy. *Neurobiol Dis*. 1996;3:97–110.
3. Lorson CL, Androphy EJ. An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum Mol Genet*. 2000;9:259–65.
4. Chiriboga CA, Swoboda KJ, Darras BT, Iannaccone ST, Montes J, De Vivo DC, et al. Results from a phase 1 study of nusinersen (ISIS-SMN(Rx)) in children with spinal muscular atrophy. *Neurology*. 2016;86:890–7.
5. Finkel RS, Chiriboga CA, Vajsar J, Day JW, Montes J, De Vivo DC, et al. Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *Lancet Lond Engl*. 2016;388:3017–26.
6. Mercuri E, Darras BT, Chiriboga CA, Day JW, Campbell C, Connolly AM, et al. Nusinersen versus Sham Control in Later-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med*. 2018;378:625–35.
7. Dhillon S. *Risdiplam: First Approval*. *Drugs*. 2020.
8. Mendell JR, Al-Zaidy S, Shell R, Arnold WD, Rodino-Klapac LR, Prior TW, et al. Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med*. 2017;377:1713–22.
9. De Vivo DC, Bertini E, Swoboda KJ, Hwu W-L, Crawford TO, Finkel RS, et al. Nusinersen initiated in infants during the presymptomatic stage of spinal muscular atrophy: Interim efficacy and safety results from the Phase 2 NURTURE study. *Neuromuscul Disord*. 2019;29:842–56.
10. Hensel N, Kubinski S, Claus P. The Need for SMN-Independent Treatments of Spinal Muscular Atrophy (SMA) to Complement SMN-Enhancing Drugs. *Front Neurol*. 2020;11:45.
11. Wadman RI, van der Pol WL, Bosboom WM, Asselman F-L, van den Berg LH, Iannaccone ST, et al. Drug treatment for spinal muscular atrophy type I. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019. doi:10.1002/14651858.CD006281.pub5.
12. Finkel RS, Mercuri E, Darras BT, Connolly AM, Kuntz NL, Kirschner J, et al. Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med*. 2017;377:1723–32.
13. Kruzik A, Fetahagic D, Hartlieb B, Dorn S, Koppensteiner H, Horling FM, et al. Prevalence of Anti-Adeno-Associated Virus Immune Responses in International Cohorts of Healthy Donors. *Mol Ther - Methods Clin Dev*. 2019;14:126–33.
14. Biondi O, Grondard C, Lécolle S, Deforges S, Pariset C, Lopes P, et al. Exercise-induced activation of NMDA receptor promotes motor unit development and survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2008;28:953–62.
15. Biondi O, Branchu J, Sanchez G, Lancelin C, Deforges S, Lopes P, et al. In vivo NMDA receptor activation accelerates motor unit maturation, protects spinal motor neurons, and enhances SMN2 gene expression in severe spinal muscular atrophy mice. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2010;30:11288–99.
16. Huang S, Xing Y, Liu Y. Emerging roles for the ER stress sensor IRE1 $\alpha$  in metabolic regulation and disease. *J Biol Chem*. 2019;294:18726–41.
17. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13:89–102.
18. Oikawa D, Kimata Y, Kohno K, Iwawaki T. Activation of mammalian IRE1 $\alpha$  upon ER stress depends on dissociation of BiP rather than on direct interaction with unfolded proteins. *Exp Cell Res*. 2009;315:2496–504.
19. Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. 1999;397:271–4.
20. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*. 2001;107:881–91.
21. Hollien J, Lin JH, Li H, Stevens N, Walter P, Weissman JS. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J Cell Biol*. 2009;186:323–31.
22. Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833.

doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.028.

23. Ng S-Y, Soh BS, Rodriguez-Muela N, Hendrickson DG, Price F, Rinn JL, et al. Genome-wide RNA-Seq of Human Motor Neurons Implicates Selective ER Stress Activation in Spinal Muscular Atrophy. *Cell Stem Cell*. 2015;17:569–84.
24. Rizzo F, Nizzardo M, Vashisht S, Molteni E, Melzi V, Taiana M, et al. Key role of SMN/SYNCRIP and RNA-Motif 7 in spinal muscular atrophy: RNA-Seq and motif analysis of human motor neurons. *Brain*. 2019;142:276–94.
25. Maury Y, Côme J, Piskorowski RA, Salah-Mohellibi N, Chevaleyre V, Peschanski M, et al. Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes. *Nat Biotechnol*. 2015;33:89–96.
26. Hsieh-Li HM, Chang JG, Jong YJ, Wu MH, Wang NM, Tsai CH, et al. A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat Genet*. 2000;24:66–70.
27. Monani UR, Sendtner M, Coover DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT, et al. 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*. 2000;9:333–9.
28. Towbin H, Gordon J. Immunoblotting and dot immunobinding--current status and outlook. *J Immunol Methods*. 1984;72:313–40.
29. Biondi O, Branchu J, Ben Salah A, Houdebine L, Bertin L, Chali F, et al. IGF-1R Reduction Triggers Neuroprotective Signaling Pathways in Spinal Muscular Atrophy Mice. *J Neurosci*. 2015;35:12063–79.
30. Branchu J, Biondi O, Chali F, Collin T, Leroy F, Mamchaoui K, et al. Shift from extracellular signal-regulated kinase to AKT/cAMP response element-binding protein pathway increases survival-motor-neuron expression in spinal-muscular-atrophy-like mice and patient cells. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2013;33:4280–94.
31. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C_T$ ) Method. *Methods San Diego Calif*. 2001;25:402–8.
32. Renvoisé B, Khoobarry K, Gendron M-C, Cibert C, Viollet L, Lefebvre S. Distinct domains of the spinal muscular atrophy protein SMN are required for targeting to Cajal bodies in mammalian cells. *J Cell Sci*. 2006;119 Pt 4:680–92.
33. Zeng L, Zampetaki A, Margariti A, Pepe AE, Alam S, Martin D, et al. Sustained activation of XBP1 splicing leads to endothelial apoptosis and atherosclerosis development in response to disturbed flow. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:8326–31.
34. Salazar-Grueso EF, Kim S, Kim H. Embryonic mouse spinal cord motor neuron hybrid cells. *Neuroreport*. 1991;2:505–8.
35. Bigot A, Klein AF, Gasnier E, Jacquemin V, Ravassard P, Butler-Browne G, et al. Large CTG Repeats Trigger p16-Dependent Premature Senescence in Myotonic Dystrophy Type 1 Muscle Precursor Cells. *Am J Pathol*. 2009;174:1435–42.
36. Singh NN, Hoffman S, Reddi PP, Singh RN. Spinal muscular atrophy: Broad disease spectrum and sex-specific phenotypes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2021.
37. Kim JK, Jha NN, Feng Z, Faleiro MR, Chiriboga CA, Wei-Lapierre L, et al. Muscle-specific SMN reduction reveals motor neuron-independent disease in spinal muscular atrophy models. *J Clin Invest*. 2020.
38. Bae D, Moore KA, Mella JM, Hayashi SY, Hollien J. Degradation of *Blos1* mRNA by IRE1 repositions lysosomes and protects cells from stress. *J Cell Biol*. 2019;218:1118–27.
39. Cross BCS, Bond PJ, Sadowski PG, Jha BK, Zak J, Goodman JM, et al. The molecular basis for selective inhibition of unconventional mRNA splicing by an IRE1-binding small molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:E869-878.
40. Clauss IM, Chu M, Zhao JL, Glimcher LH. The basic domain/leucine zipper protein hXBP-1 preferentially binds to and transactivates CRE-like sequences containing an ACGT core. *Nucleic Acids Res*. 1996;24:1855–64.
41. Acosta-Alvear D, Zhou Y, Blais A, Tsikitis M, Lents NH, Arias C, et al. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol Cell*. 2007;27:53–66.
42. Grondard C, Biondi O, Armand A-S, Lécolle S, Della Gaspera B, Pariset C, et al. Regular exercise prolongs survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2005;25:7615–22.
43. Tsai L-K, Tsai M-S, Lin T-B, Hwu W-L, Li H. Establishing a standardized therapeutic testing

protocol for spinal muscular atrophy. *Neurobiol Dis.* 2006;24:286–95.

44. Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, et al. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6 $\alpha$  and XBP1. *Dev Cell.* 2007;13:365–76.

45. Shoulders MD, Ryno LM, Genereux JC, Moresco JJ, Tu PG, Wu C, et al. Stress-independent activation of XBP1s and/or ATF6 reveals three functionally diverse ER proteostasis environments. *Cell Rep.* 2013;3:1279–92.

46. Lee A-H, Heidtman K, Hotamisligil GS, Glimcher LH. Dual and opposing roles of the unfolded protein response regulated by IRE1 $\alpha$  and XBP1 in proinsulin processing and insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:8885–90.

47. Lauria F, Bernabò P, Tebaldi T, Groen EJN, Perenthaler E, Maniscalco F, et al. SMN-primed ribosomes modulate the translation of transcripts related to spinal muscular atrophy. *Nat Cell Biol.* 2020;22:1239–51.

48. Valdés P, Mercado G, Vidal RL, Molina C, Parsons G, Court FA, et al. Control of dopaminergic neuron survival by the unfolded protein response transcription factor XBP1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:6804–9.

49. Tsaytler P, Harding HP, Ron D, Bertolotti A. Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis. *Science.* 2011;332:91–4.

50. Pérez-Arancibia R, Rivas A, Hetz C. (off)Targeting UPR signaling: the race toward intervening ER proteostasis. *Expert Opin Ther Targets.* 2018;22:97–100.

51. Sun X, Aimé P, Dai D, Ramalingam N, Crary JF, Burke RE, et al. Guanabenz promotes neuronal survival via enhancement of ATF4 and parkin expression in models of Parkinson disease. *Exp Neurol.* 2018;303:95–107.

52. Tsuru A, Imai Y, Saito M, Kohno K. Novel mechanism of enhancing IRE1 $\alpha$ -XBP1 signalling via the PERK-ATF4 pathway. *Sci Rep.* 2016;6:24217.

53. Majumder M, Huang C, Snider MD, Komar AA, Tanaka J, Kaufman RJ, et al. A Novel Feedback Loop Regulates the Response to Endoplasmic Reticulum Stress via the Cooperation of Cytoplasmic Splicing and mRNA Translation. *Mol Cell Biol.* 2012;32:992–1003.

**Titre : Utilisation des cellules souches pluripotentes humaines pour avancer dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques associés à l'Amyotrophie Spinale Infantile**

**Mots clés :** Amyotrophie spinale infantile, Cellules souches pluripotentes humaines, Motoneurones spinaux et crâniens, Jonction neuromusculaire

**Résumé :** L'amyotrophie spinale infantile (SMA) est l'une des formes de maladie génétique les plus courantes chez l'enfant. La SMA se caractérise par une quantité insuffisante de protéine SMN (survival motor neuron), due à des mutations du gène *SMN1*, induisant la dégénérescence des neurones moteurs, la faiblesse et l'atrophie des muscles squelettiques. Au cours de la dernière décennie, trois traitements augmentant les niveaux de protéines SMN ont été mis sur le marché. Malgré des résultats remarquables, différentes études soulignent la nécessité de développer des stratégies thérapeutiques supplémentaires, et indépendantes de SMN, pour fournir des soins optimaux à tous les patients atteints de SMA. Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques devrait permettre d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la SMA. Les modèles de criblage *in vitro* fonctionnels sont manquants dans le domaine de la SMA. Ainsi, le premier objectif de mon projet était d'évaluer le potentiel d'un nouveau modèle humain de co-culture SMA, associant des motoneurones dérivés de cellules souches pluripotentes humaines et des cellules musculaires primaires humaines, pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Ce système intercellulaire reproduit la mort spécifique des motoneurones spinaux SMA, mais aussi les défauts synaptiques présents avant la mort cellulaire spécifique. Basé sur une cible agnostique, ce système nous a permis d'identifier le potentiel des inhibiteurs JNK et GSK-3 pour normaliser les phénotypes cellulaires associés à la SMA, et indépendamment de SMN. D'autres part, alors que les motoneurones spinaux sont vulnérables, d'autres groupes de motoneurones, y compris les motoneurones crâniens, qui innervent les muscles du visage et des yeux, sont épargnés dans la SMA pour des raisons inconnues. Dans ce contexte, le second objectif de ma thèse était de mieux comprendre comment la perte d'une protéine ubiquitaire peut induire la dégénérescence d'un sous-type cellulaire spécifique, dans le but d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques. Pour cela, nous avons généré des populations homogènes de motoneurones spinaux et crâniens dérivés de hiPSC dont l'expression de SMN est diminuée. Alors que la survie des motoneurones spinaux SMA ainsi que leur connectivité avec la cible musculaire sont affectées, les motoneurones crâniens SMA sont retrouvés épargnés. L'activation de voies de signalisation apoptotiques a été spécifiquement observée dans les motoneurones spinaux SMA. Par une approche transcriptomique, nous avons identifié une dérégulation spécifique dans les motoneurones spinaux SMA de gènes impliqués dans la plasticité synaptiques, pouvant affecter l'intégrité de la jonction neuromusculaire. Dans l'ensemble, nos résultats démontrent la possibilité de reproduire *in vitro* la vulnérabilité sélective associée à la SMA et devraient faciliter l'identification de nouvelles approches thérapeutiques.