

Les cellules neuronales dérivées des cellules souches pluripotentes induites humaines : modélisation des maladies du motoneurone

Delphine Bohl

Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM) Inserm U1127 - CNRS UMR-7225 - UPMC - Université Paris 6, Équipe S. BOILLÉE « Causes de la SLA et mécanismes de la dégénérescence motoneuronale », Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, 47 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

Auteur correspondant : Delphine Bohl, delphine.bohl@icm-institute.org

Reçu le 6 janvier 2016

Résumé – Parmi les maladies du motoneurone, l'amyotrophie spinale proximale de type 1 et la sclérose latérale amyotrophique sont deux maladies très agressives qui n'ont pas de traitement curatif. Avec la découverte des cellules souches pluripotentes induites humaines, les iPS, les chercheurs ont aujourd'hui à leur disposition un outil puissant pour générer des motoneurons humains en culture et étudier les défauts pathologiques des cellules de patients. Dans cette revue, nous verrons quels outils utiles à l'étude des motoneurons de patients ont été développés à partir des cellules iPS et les différents modèles cellulaires qui ont été générés. Nous verrons également comment ces modèles ont été validés et quelles sont les recherches en cours afin d'identifier de nouvelles pistes thérapeutiques.

Mots clés : Cellules iPS / sclérose latérale amyotrophique / amyotrophie spinale proximale / motoneurons / modélisation

Abstract – Neuronal cells derived from induced pluripotent stem cells to model motoneuron diseases.

Among motor neuron diseases, spinal muscular atrophy type 1 and amyotrophic lateral sclerosis are very aggressive diseases with no cure. With the breakthrough of human induced pluripotent stem cells, iPS, researchers have now at their disposal a powerful tool to generate human motor neurons in culture and study the pathological defects in patient cells. In this review, we will see which tools for the study of patients motoneurons were developed from iPS cells and the different cellular models that were generated. We will also see how these models were validated and current research to identify new therapeutic leads.

Key words: iPS cells / amyotrophic lateral sclerosis / spinal muscular atrophy / motoneurons / disease modelling

Abréviations

BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>	iPSc	cellules souches pluripotentes induites
DAPT	inhibiteur de gamma-sécrétase	SLA	sclérose latérale amyotrophique
ES	cellules souches embryonnaires	SMA	amyotrophie spinale proximale
F-SLA	cas familiaux de SLA	SMN	<i>Survival Motor Neuron</i>
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>	S-SLA	cas sporadiques de SLA

1 Introduction

Les maladies du motoneurone forment un groupe de maladies neurologiques progressives qui affectent les neurones contrôlant des activités musculaires volontaires telles que parler, marcher ou respirer. Ces maladies peuvent toucher des adultes et des enfants. Elles se caractérisent par une faiblesse musculaire suivie d'une atrophie progressive des muscles qui aboutit à une paralysie et parfois à la mort des patients. Les seuls traitements actuels sont les soins spécifiques et le soulagement des douleurs.

Les maladies du motoneurone peuvent être classées en fonction de la localisation des motoneurones qui dégénèrent. Il s'agit soit des motoneurones supérieurs localisés dans le cortex moteur, soit des motoneurones inférieurs situés dans le tronc cérébral et la moelle épinière. Les motoneurones supérieurs se connectent soit avec les motoneurones du tronc cérébral qui innervent les muscles de la face et la langue, soit avec les motoneurones spinaux qui innervent les membres supérieurs, les muscles intercostaux (tel que le diaphragme) et les muscles inférieurs. Parmi les maladies du motoneurone, on peut distinguer celles qui touchent de façon prédominante les motoneurones supérieurs telles que la sclérose latérale primitive et la paralysie pseudobulbaire, ou les motoneurones inférieurs comme l'amyotrophie spinale proximale et la paralysie bulbaire. Une maladie touchant à la fois les motoneurones supérieurs et inférieurs est la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA).

Dans cet article je décrirai en détail deux de ces maladies fatales chez l'enfant et l'adulte : l'amyotrophie spinale proximale (SMA) et la SLA, respectivement. En effet, ces deux maladies très graves ne bénéficient actuellement d'aucun traitement curatif. Dans leurs formes les plus sévères les patients meurent en 2 à 5 ans. Malgré de nombreuses études pour mieux comprendre ces maladies et trouver des molécules thérapeutiques, réalisées essentiellement sur des modèles animaux, aucune molécule ni aucun traitement n'ont encore permis de soigner ces patients. Dans ce contexte, la technologie des cellules souches pluripotentes induites humaines (iPSc) apparaît comme un nouvel outil à la fois pour les chercheurs mais aussi pour l'industrie pharmaceutique et pour le criblage de médicaments. D'une part ces cellules peuvent être générées à partir de n'importe quel individu sain ou malade et d'autre part on peut pour la première fois produire en culture des motoneurones humains, inaccessibles en temps normal puisqu'on ne peut pas faire de biopsie du cerveau ou de la moelle épinière de patients. Ainsi les challenges pour la SLA et la SMA sont de pouvoir obtenir des motoneurones de patients en culture, de mettre en évidence des phénotypes pathologiques spécifiques de la maladie

dans ces cellules et enfin d'identifier des nouvelles cibles thérapeutiques.

2 La différenciation des iPSc en motoneurones et en autres cellules de leur environnement

2.1 Les motoneurones

De nombreux protocoles sont aujourd'hui décrits dans la littérature et permettent de générer à partir de cellules souches pluripotentes humaines des précurseurs neuraux qui peuvent ensuite être différenciés vers différents sous-types neuraux (neurones et cellules gliales) suivant des protocoles spécifiques (Han *et al.*, 2011). La production de ces précurseurs neuraux repose sur des études préalables qui ont décrit de façon détaillée le développement du système nerveux central ainsi que les cascades de signalisation conduisant à la différenciation des cellules souches pluripotentes. Ainsi l'utilisation de molécules capables d'inhiber la signalisation médiée par le TGF- β (*transforming growth factor β*) et les BMP (*bone morphogenetic proteins*) permet la conversion très efficace des cellules pluripotentes en précurseurs neuraux. Il a été montré que cette double inhibition, appelée inhibition double-SMAD, augmentait la conversion neurale tout en inhibant la différenciation mésenchymateuse (Chambers *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010). Ainsi le traitement des cellules souches pluripotentes par des molécules telles que *Noggin*, *Dorsomorphin* et SB431542, permet de générer des précurseurs en moins d'une semaine et avec une efficacité de près de 90 % (Amoroso *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014; Qu *et al.*, 2014; Maury *et al.*, 2015).

La production de ces précurseurs neuraux est la première étape vers la génération de motoneurones et plusieurs équipes ont aujourd'hui développé des protocoles à partir de cellules souches embryonnaires (ES) ou d'iPSc pour obtenir des motoneurones humains. Pour étudier la SMA et la SLA, il est apparu important de pouvoir avant tout produire des motoneurones spinaux. Ainsi à l'heure actuelle il existe des protocoles de plus en plus efficaces et rapides pour la génération de motoneurones spinaux mais très peu de protocoles décrivant la génération de motoneurones supérieurs ou crâniens (Burkhardt *et al.*, 2013; Maury *et al.*, 2015). Les premiers protocoles de génération de motoneurones spinaux, tel que celui que nous avons utilisé dans notre équipe (Hu & Zhang, 2009; Toli *et al.*, 2015), reposaient essentiellement sur un traitement des cellules par l'acide rétinoïque, pour caudaliser les neurones, et par le morphogène *Sonic Hedgehog* pour les ventraliser. Les premiers protocoles étaient assez longs

(2 à 3 mois de culture), avec des pourcentages relativement faibles en motoneurones (5 à 30 %) et des cultures complexes qui comportent des corps cellulaires regroupés, des cellules prolifératives persistantes et des états de maturation hétérogènes des neurones générés, rendant quasi impossibles les comparaisons entre les motoneurones contrôles et ceux des malades. Afin de résoudre certains de ces problèmes, nous avons développé une approche de tri au FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) basé sur la sélection des motoneurones avec deux marqueurs spécifiques (Toli *et al.*, 2015). Grâce à la technique que nous avons mise au point, nous avons pu trier des motoneurones jeunes et obtenir des cultures pures, dépourvues de cellules prolifératives et à des densités idéales pour étudier les motoneurones individuellement. En parallèle à nos travaux, et de façon complémentaire, des équipes ont développé de nouveaux protocoles permettant d'obtenir des cultures très enrichies en motoneurones et surtout synchronisées afin de pouvoir comparer les motoneurones témoins et pathologiques à des stades équivalents de maturation (Chen *et al.*, 2014; Maury *et al.*, 2015). Ainsi l'utilisation d'un activateur de la voie de signalisation Wnt, le CHIR99021, en coopération avec l'acide rétinoïque et un analogue de *Sonic Hedgehog*, a permis une spécification accélérée et efficace des progéniteurs de motoneurones, et l'ajout de DAPT, un inhibiteur de γ -sécrétase inhibant la voie de signalisation *Notch*, a permis la conversion efficace de ces progéniteurs en motoneurones post-mitotiques. Ces améliorations permettent aujourd'hui d'avoir en moins de trois semaines des cultures contenant plus de 70 % de motoneurones post-mitotiques et sans contamination par des cellules prolifératives. De plus, ces motoneurones peuvent être maintenus en culture plusieurs semaines afin d'étudier leur maturation, leur survie et leurs défauts pathologiques.

2.2 Les cellules gliales

In vivo, les astrocytes ont des identités régionales et peuvent être dans des états quiescents ou activés. *In vitro*, peu de protocoles existent à ce jour pour générer des astrocytes à partir d'iPSc humaines mais leurs efficacités sont élevées avec plus de 90 % d'astrocytes GFAP positifs produits en 2 à 3 mois (McGivern *et al.*, 2013; Serio *et al.*, 2013). Néanmoins, leur état d'activation ou leur identité régionale ne sont à ce jour pas définis. Pour générer des oligodendrocytes des protocoles existent (Ogawa *et al.*, 2011; Douvaras & Fossati, 2015) mais ils sont assez longs (2 à 6 mois) et ne permettent de générer que des progéniteurs immatures incapables de myéliniser des axones en culture. Ces cellules sont donc considérées aujourd'hui comme trop immatures pour la modélisation de pathologies *in vitro*.

3 La modélisation de l'amyotrophie spinale proximale (SMA) à l'aide des cellules iPS humaines

3.1 La SMA

La SMA est la première cause génétique de mortalité chez les enfants avec une incidence de 1 pour 6000 à 10 000 naissances. Elle entraîne une dégénérescence sélective des motoneurones inférieurs de la moelle épinière. Les personnes sont atteintes de faiblesses musculaires, de difficultés respiratoires, conduisant à une paralysie. En fonction de l'âge de début et de la sévérité de la maladie, les patients sont répartis dans 4 catégories cliniques (type 1 à 4). La SMA de type 1 est la forme la plus sévère. Elle atteint les enfants avant l'âge de 6 mois et la majorité d'entre eux meurent avant deux ans par suite de difficultés respiratoires. La SMA de type 2 atteint des enfants entre 6 et 18 mois avec une progression variable et une espérance de vie réduite. Les SMA de type 3 et 4 se développent plus tardivement avec une espérance de vie non affectée.

La SMA est une maladie récessive autosomale. Le gène muté ou délété responsable de cette maladie est le gène *SMN1* (*Survival Motor Neuron 1*). Ce gène a été découvert en 1995 (Lefebvre *et al.*, 1995) et code pour une protéine ubiquitaire ayant des fonctions de gène de ménage. *SMN1* intervient dans la biogénèse des protéines d'ARN, la transcription et l'épissage. Par conséquent, bien que les motoneurones mutants soient les premiers à être touchés, la maladie affecte aussi de nombreux organes.

Afin d'étudier la maladie, des modèles murins de SMA ont été créés. Mais malheureusement la délétion totale du gène *smn1* chez la souris est mortelle. Chez l'Homme, il existe un gène quasi-identique à *SMN1*, qui est appelé *SMN2* et qui produit 10 % de protéine SMN fonctionnelle. Ce gène *SMN2* diffère du gène *SMN1* par quelques nucléotides dans l'exon 7 et ceci entraîne un épissage dans 90 % des cas. Sachant que l'Homme possède jusqu'à 8 copies du gène *SMN2*, il est suggéré que la sévérité de la maladie est influencée par ce nombre de copies. Du fait de cette situation génétique humaine unique, des modèles murins ont été créés par l'insertion dans le génome de la souris *smn1*^{-/-} de nombres variables de copies du gène *SMN2*. Grâce à ces modèles, différents mécanismes pouvant être impliqués dans la mort sélective des motoneurones de patients SMA ont été identifiés : des défauts du métabolisme ARN et de l'épissage, du transport axonal, de la croissance axonale, du développement du motoneurone et de la formation/stabilité des jonctions neuromusculaires (Farrar & Kiernan, 2015).

Tableau 1. Les modèles iPSc de SMA.

Patient	Phénotype SMA	Molécule testée/thérapie	Référence
1 patient, type 1	Réduction du nombre et de la taille des motoneurones	–	(Ebert <i>et al.</i> , 2009)
2 patients, type 1	Augmentation de l'apoptose médiée par FAS-ligand	Anticorps bloquant FAS	(Sareen <i>et al.</i> , 2012)
2 patients, type 1	Diminution du nombre de gems, réduction du nombre et de la taille des motoneurones, défauts de croissance axonale, défauts de formation des jonctions neuromusculaires	Oligonucléotides	(Corti <i>et al.</i> , 2012)
3 patients, type 1	Hyper-excitabilité	–	(Liu <i>et al.</i> , 2015)
2 patients, type 1	Défauts dans la formation et la maturation des jonctions neuromusculaires	Acide valproïque	(Yoshida <i>et al.</i> , 2015)
1 patient, type 1 1 patient, type 2	Diminution de la taille du soma des motoneurones, augmentation de l'apoptose. Profils d'expression génique : hyper-activation de la voie du stress du réticulum endoplasmique	Inhibiteurs du stress du réticulum endoplasmique	(Ng <i>et al.</i> , 2015)
4 patients, famille consanguine	Différences dans les nombres de motoneurones et la longueur des neurites, en fonction des patients	–	(Boza-Moran <i>et al.</i> , 2015)
1 patient, type 1 1 patient, type 2	Augmentation des niveaux de protéine SMN	Modificateurs d'épissage	(Naryshkin <i>et al.</i> , 2014)

3.2 Les modèles iPS

Depuis 2008, plusieurs publications ont décrit la génération de cellules iPS humaines à partir de cellules de patients atteints de SMA de type 1 ou 2 et leur différenciation en motoneurones (tableau 1) (Ebert *et al.*, 2009; Corti *et al.*, 2012; Sareen *et al.*, 2012; Naryshkin *et al.*, 2014; Boza-Moran *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015; Ng *et al.*, 2015; Yoshida *et al.*, 2015). Des phénotypes affectant les motoneurones de patients SMA par rapport aux motoneurones témoins ont été décrits, tels que des altérations de leur nombre et de leur croissance neuritique (Ebert *et al.*, 2009; Corti *et al.*, 2012; Boza-Moran *et al.*, 2015), des modifications du nombre de gems (Corti *et al.*, 2012) (les gems étant des complexes protéiques nucléaires spécifiques se formant en présence de la protéine SMN et étant essentiels pour l'épissage), une augmentation de l'apoptose (Sareen *et al.*, 2012; Ng *et al.*, 2015), et des défauts de formation et de maturation des jonctions neuromusculaires (Corti *et al.*, 2012; Yoshida *et al.*, 2015). En particulier, Corti *et al.* (2012) ont généré des cellules dérivées de deux patients atteints de SMA de type 1 et ont corrigé génétiquement *SMN2* avec des oligonucléotides, afin d'invalider son site d'épissage au

niveau de l'exon 7 et ainsi permettre la production de la protéine SMN fonctionnelle. Ils ont tout d'abord mis en évidence des altérations spécifiques au niveau du nombre de gems, du nombre de motoneurones et des jonctions neuromusculaires dans les iPSc-SMA ou les motoneurones dérivés. Ils ont ensuite montré que dans les iPSc et les motoneurones dans lesquels le gène *SMN2* avait été corrigé, ces altérations n'étaient plus présentes. Cette approche a permis ainsi de rétablir des niveaux normaux de protéine SMN et c'est le principe actuel des thérapies SMN-dépendantes. Ainsi *PTC Therapeutics*[®] et le centre de recherche de Roche[®] (Basel) ont initié récemment un essai clinique chez des patients après avoir identifié des composés chimiques capables de modifier l'épissage de *SMN2* et ainsi d'augmenter les quantités de protéine SMN dans les cellules. Ils ont fait préalablement la démonstration de l'efficacité de ces composés chez des souris et dans des motoneurones dérivés d'iPSc de patients (Naryshkin *et al.*, 2014). L'essai de phase 1 avec le RG7800[®] a été bien toléré chez des volontaires sains. La phase 2 est en cours.

Une autre approche, indépendante de la stratégie visant à augmenter les niveaux protéiques de SMN, a été proposée par Ng *et al.* (2015). Dans ce travail, les

auteurs ont purifié des motoneurons humains dérivés d'iPSc de patients SMA de type 1 et de type 2 et ont réalisé des analyses de séquençage des ARN permettant de mettre en évidence des différences au niveau de l'expression de nombreux gènes. Les analyses des motoneurons de patients ont révélé en particulier un stress du réticulum endoplasmique et une réponse aux protéines mal repliées (appelée *unfolded protein response* ou UPR). Le traitement des motoneurons avec différentes molécules inhibitrices du stress du réticulum endoplasmique a permis d'identifier notamment le Guanabenz[®] comme molécule capable de réduire ce stress.

3.3 Conclusion

La SMA est une maladie de l'enfant qui touche avant tout les motoneurons mais qui est de plus en plus vue comme une maladie affectant de nombreux organes. Il n'existe ni traitement pour les patients ni diagnostic prénatal, alors que les études chez l'animal ont montré qu'une intervention thérapeutique doit être faite le plus tôt possible pour être bénéfique pour les patients. Deux approches thérapeutiques sont aujourd'hui envisagées : (i) des thérapies SMN-dépendantes qui visent à augmenter les niveaux de protéine SMN, soit avec des petites molécules (telle que l'acide valproïque), soit avec des oligonucléotides capables de corriger l'épissage de SMN2, ou encore par thérapie génique avec des vecteurs viraux exprimant SMN, et (ii) des thérapies SMN-indépendantes ciblant des voies qui contribuent à la pathogénèse et qui peuvent moduler le phénotype SMA. La combinaison des deux approches pourrait permettre de ralentir efficacement l'évolution de la maladie en ciblant à la fois les motoneurons et les autres organes malades (Wirth *et al.*, 2015).

4 La modélisation de la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) avec des cellules iPS humaines

4.1 La SLA

La SLA, appelée aussi maladie de Charcot, est la plus fréquente des maladies du motoneurone chez l'adulte. Elle affecte des personnes d'environ 60 ans et est due à la dégénérescence des motoneurons supérieurs et inférieurs dans le cerveau et la moelle épinière, conduisant à une paralysie des muscles et notamment des muscles respiratoires. Plus de 100 000 patients sont affectés dans le monde avec une espérance de vie de 2 à 5 ans après le diagnostic. C'est une maladie fatale pour laquelle le seul traitement disponible est le Riluzole[®] qui prolonge la vie des patients d'environ 3 mois (Bensimon *et al.*, 1994). La majorité

des cas sont sporadiques (S-SLA) et seulement 10 % sont des cas familiaux (F-SLA). Plusieurs gènes ont été identifiés comme étant la cause de la maladie et pour la majorité des cas les mutations identifiées dans ces gènes sont autosomales dominantes, ce qui signifie que les cellules expriment une protéine normale et une forme anormale. Ainsi la maladie présente une hétérogénéité génétique avec 4 gènes principaux et qui sont responsables de ~70 % des formes de F-SLA (Su *et al.*, 2014). Le premier gène identifié en 1993 est celui codant pour la superoxyde dismutase 1 (*SOD1*) et dont les mutations sont la cause de SLA pour 10 % des F-SLA. En 2008 et 2009 ont été identifiés des mutations dans 2 gènes impliqués dans le métabolisme de l'ARN, les gènes *TARDBP* et *FUS* (5 % des F-SLA). Enfin en 2011, des expansions introniques d'hexanucléotides dans le gène *C9ORF72* ont été identifiées et représentent la première cause de SLA (~23–46 %). La fonction de ce gène est inconnue.

Les données pathologiques humaines dont on dispose pour mieux comprendre ce syndrome sont des biopsies *post-mortem* de tissus de patients. Ces analyses de tissus ont montré une dégénérescence et une perte des motoneurons dans le cortex et la moelle épinière, une formation d'agrégats, notamment de la protéine TDP-43, et une réactivité gliale. Néanmoins, ces signes pathologiques correspondent à un stade terminal de la maladie. Afin de comprendre l'évolution de la pathologie et les mécanismes conduisant à la mort des motoneurons, des modèles murins ont été créés et, aujourd'hui, seuls les modèles générés à partir des mutations dans le gène *sod1* sont capables de reproduire la maladie humaine. Toutes les hypothèses pour expliquer la dégénérescence sélective des motoneurons reposent sur ce modèle et ces hypothèses incluent des défauts de repliement protéique, des dysfonctions mitochondriales et du réticulum endoplasmique, des problèmes de transport axonal, ou encore une excitotoxicité. De plus, alors que l'initiation de la maladie a lieu au niveau du motoneurone, il a été montré que l'environnement, composé des astrocytes, des oligodendrocytes et de la microglie, participe à l'évolution de la maladie (Boillée *et al.*, 2006). Dans ce contexte, la génération de motoneurons humains porteurs de mutations dans différents gènes de SLA est d'un intérêt évident, afin de pouvoir analyser et comparer si les mécanismes identifiés dans le modèle murin muté dans le gène *sod1* sont identiques ou différents de ceux des motoneurons de patients ayant différentes formes de SLA.

4.2 Les modèles iPS

Depuis 2008, plus de vingt publications ont rapporté la génération de cellules iPS produites à partir de

Tableau 2. Les modèles iPS de SLA.

Mutation	Phénotype	Molécule testée/thérapie	Référence
TARDBP -TDP-43 Q343R TDP-43 M337V TDP-43 G298S -TDP-43 M337V -TDP-43 M337V	Agrégats cytosoliques de TDP-43, réduction du nombre de neurites, susceptibilité à l'arsénite Augmentation de TDP-43 cytosolique Augmentation de TDP-43 insoluble	Acide anacardique - siRNA	(Egawa <i>et al.</i> , 2012) (Bilican <i>et al.</i> , 2012) (Nishimura <i>et al.</i> , 2014)
FUS -FUS R521C -FUS R521C FUS R514S FUS P525L -FUS 525L	Accumulation cytoplasmique de FUS Accumulation cytoplasmique de FUS et recrutement de FUS dans des granules de stress Agrégats cytoplasmiques de FUS	- - -	(Japtok <i>et al.</i> , 2015) (Lenzi <i>et al.</i> , 2015) (Liu <i>et al.</i> , 2015)
C9ORF72 -G4C2 expansions -G4C2 expansions -G4C2 expansions	Foyers d'ARN, polyprotéines, augmentation de la susceptibilité au glutamate Foyers d'ARN, colocalisation avec hnRNPA1 et Pur-alpha Formation de quadruplexes, stress du nucléole avec perturbation des modifications des ARN	Oligonucléotides antisens Oligonucléotides antisens -	(Donnelly <i>et al.</i> , 2013) (Sareen <i>et al.</i> , 2013) (Haeusler <i>et al.</i> , 2014)
SOD1 -SOD1 L144F -SOD1 A4V SOD1 N139K SOD1 V148G -SOD1 N87S SOD1 S106L -SOD1 A4V SOD1 D90A	Non étudié Non étudié Non étudié Agrégation de neurofilaments, dégénérescence des neurites	- - - -	(Dimos <i>et al.</i> , 2008) (Amoroso <i>et al.</i> , 2013) (Chestkov <i>et al.</i> , 2014) (Chen <i>et al.</i> , 2014)
Comparaison de : -TDP-43 A315T FUS G1566A SOD1 A4V SOD1 N139K SLA sporadiques -SOD1 A4V G4C2 expansions	Agrégats intra-nucléaires de TDP-43 dans 3/16 cultures de motoneurones S-SLA Défauts mitochondriaux dans les mSOD1 et stress du réticulum endoplasmique	Glycosides cardiaques -	(Burkhardt <i>et al.</i> , 2013) (Kiskinis <i>et al.</i> , 2014)

cellules de patients avec des formes familiales porteurs de mutations dans les gènes *SOD1*, *C9ORF72*, *TARDBP* et *FUS*, et des formes sporadiques de SLA (tableau 2). Les études portant sur les cellules iPS générées à partir de patients porteurs de mutations dans les gènes *TARDBP* ou *FUS* codant pour les protéines nucléaires TDP-43 (Bilican *et al.*, 2012;

Egawa *et al.*, 2012; Burkhardt *et al.*, 2013; Nishimura *et al.*, 2014) et *FUS* (Japtok *et al.*, 2015; Lenzi *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2015) ont avant tout validé ces modèles cellulaires en montrant la présence d'agrégats protéiques, nucléaires et/ou cytoplasmiques, contenant les protéines TDP-43 ou *FUS* dans les motoneurones dérivés des iPS. La présence d'agrégats

protéiques dans les motoneurons de patients SLA est en effet considérée comme un marqueur pathologique de la SLA. Ceci étant et de façon intéressante, alors que les données obtenues sur les tissus *post-mortem* ont montré la présence d'agrégats intranucléaires et une délocalisation cytoplasmique de la protéine TDP-43 dans quelques motoneurons chez tous les patients, sauf ceux porteurs de mutations dans le gène *SOD1*, Burkhardt *et al.* (2013) n'ont pas pu reproduire ce phénotype de façon systématique dans des motoneurons dérivés des iPSc de patients. Ils ont comparé des motoneurons HB9-positifs et des neurones HB9-négatifs dérivés d'iPSc de 24 patients présentant soit des formes sporadiques de SLA, soit des formes SLA mutées dans les gènes *SOD1*, *TARDBP* et *FUS* et ils ont observé la présence d'agrégats TDP-43 dans les motoneurons et les neurones de seulement 3 cas sur 16 de SLA sporadique et dans aucun cas de SLA génétique. Des analyses de motoneurons plus âgés seraient peut être nécessaires pour préciser l'apparition du phénotype. Ces résultats suggèrent néanmoins que ces agrégats se formeraient plutôt tardivement au décours de la maladie et donc ne reflèteraient pas la cause à traiter mais en seraient plutôt la conséquence. L'étude a permis d'identifier des composés approuvés par la FDA, des glycosides cardiaques, comme pouvant réduire la formation des agrégats observés.

Quatre études ont développé des modèles iPSc à partir de cellules de patients porteurs d'expansions d'hexanucléotides dans le gène *C9ORF72* (Donnelly *et al.*, 2013; Sareen *et al.*, 2013; Haeusler *et al.*, 2014; Kiskinis *et al.*, 2014). La fonction du gène *C9ORF72* étant inconnue et les centaines d'expansions GGGGCC se trouvant dans la région du promoteur avant le premier ATG codant, les analyses se sont focalisées sur les conséquences de la présence des expansions sur l'expression du gène. Ainsi la présence des expansions peut entraîner une perte d'expression du gène, des ARN issus de transcription avortée peuvent former des structures particulières les rendant toxiques avec la formation de foyers d'ARN et la séquestration de protéines de liaison à l'ARN, et les expansions peuvent être traduites en différentes polyprotéines qui s'accumulent (Haeusler *et al.*, 2014; Vatovec *et al.*, 2014). Ainsi il a été montré dans les motoneurons dérivés des iPSc de ces patients qu'il y avait formation de foyers d'ARN, des accumulations de polyprotéines et la formation de quadruplexes de transcrits induisant un stress nucléolaire. Ces observations ont permis de valider ces modèles et il a été montré qu'il était possible de supprimer la formation de foyers d'ARN à l'aide d'oligonucléotides antisens.

Enfin, plusieurs publications ont rapporté la génération de cellules iPSc de patients porteurs de mutations dans le gène *SOD1* (Dimos *et al.*, 2008; Amoroso *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014;

Chestkov *et al.*, 2014; Kiskinis *et al.*, 2014), mais peu d'études de phénotypes ont été signalées (Chen *et al.*, 2014; Kiskinis *et al.*, 2014). Chen *et al.* (2014) ont étudié des motoneurons dérivés d'iPSc de patients porteurs des mutations les plus fréquentes et sévères aux Etats-Unis et en Europe (A4V et D90A, respectivement), et ils ont montré la formation d'agrégats de neurofilaments spécifiquement dans les motoneurons, suivie d'une dégénérescence neuritique. Kiskinis *et al.* (2014) ont réalisé des profils d'expression génique sur des motoneurons de patients mutés dans le gène *SOD1* et ont mis en évidence des défauts au niveau des mitochondries des motoneurons avec une désorganisation morphologique et la formation de regroupements neuritiques, un phénotype pouvant être amélioré après correction de la mutation génétique dans les cellules du patient. Ils ont également montré des perturbations de la réponse aux protéines mal repliées avec un stress du réticulum endoplasmique, comme décrit précédemment dans un modèle de SMA (Ng *et al.*, 2015). De façon intéressante, cette étude a été complétée par des analyses en PCR quantitative sur des motoneurons de patients mutés dans le gène *C9ORF72* afin de comparer ces motoneurons avec ceux de patients mutés dans le gène *SOD1*. Ainsi des altérations d'expression génique communes mais aussi différentes ont été trouvées entre les deux types de SLA et des analyses cellulaires plus détaillées sont à présent nécessaires afin d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles communes.

4.3 Conclusion

La SLA est une maladie très grave et fatale en quelques années. Aucun traitement n'existe et il y a urgence à trouver de nouvelles pistes thérapeutiques. Avec la découverte concomitante des nouveaux gènes responsables de la SLA (dont *C9ORF72*) et impliquant le métabolisme de l'ARN, et de la technologie iPSc en 2007 permettant de générer des modèles uniques pour étudier les motoneurons de tout patient SLA, de nouvelles approches thérapeutiques sont envisagées, notamment l'utilisation des oligonucléotides anti-sens. Une première étude de phase I a montré la tolérance d'une telle approche chez des patients mutés dans le gène *SOD1* (Miller *et al.*, 2013). La même stratégie pourra être envisagée pour des patients atteints de la forme de SLA la plus fréquente. Une autre étude, impliquant des analyses de survie de motoneurons dérivés à la fois de cellules ES de souris et de cellules iPSc de patients SLA porteurs de mutations dans les gènes *SOD1* et *TDP-43*, a permis d'identifier la kenpaullone[®], un inhibiteur de la voie d'apoptose neuronale, comme une molécule permettant la survie des motoneurons de patients (Yang *et al.*, 2013). Cette molécule émerge en tant que molécule préclinique

d'intérêt mais des travaux sont encore nécessaires afin d'améliorer son efficacité et sa bio-distribution dans le système nerveux central.

5 Conclusion

Les cellules iPS sont aujourd'hui un outil incontournable pour étudier les cellules du système nerveux central, notamment parce qu'il est quasi impossible d'obtenir des biopsies de ce tissu au décours des maladies neurologiques. Pour les maladies du motoneurone telles que la SMA et la SLA, les chercheurs ont aujourd'hui à leur disposition des cellules iPS de patients et des protocoles leur permettant de générer de façon très efficace et rapide des motoneurons spinaux touchés dans ces pathologies. Les modèles cellulaires développés ont été validés sur des phénotypes préalablement décrits dans des modèles murins ou sur des biopsies *post-mortem* de patients. À présent, d'autres phénotypes sont recherchés et tous les travaux montrent que ces nouveaux modèles sont des outils d'intérêt qui pourraient accélérer la découverte de médicaments innovants. Il reste cependant beaucoup à faire. Il est notamment important de prouver que les phénotypes observés sont bien dus aux mutations des patients et pour cela la technologie CRISPR/Cas9 est un outil qui est de plus en plus développé dans de nombreux laboratoires afin de corriger les mutations génétiques par recombinaison homologue. Il sera également intéressant dans l'avenir d'étudier les autres types de motoneurons, supérieurs ou crâniens, pour comparer et essayer de comprendre pourquoi certains motoneurons sont épargnés par la neurodégénérescence. Enfin, l'étude des autres cellules de l'environnement des motoneurons telles que les astrocytes, les oligodendrocytes, la microglie, ainsi que les macrophages situés en périphérie des axones connectés aux muscles malades, est un champ de recherche qui émerge et qui pourrait également apporter de nouvelles pistes thérapeutiques.

Références

- Amoroso, M.W., Croft, G.F., Williams, D.J., O'Keeffe, S., Carrasco, M.A., Davis, A.R., Roybon, L., Oakley, D.H., Maniatis, T., Henderson, C.E., and Wichterle, H. (2013). Accelerated high-yield generation of limb-innervating motor neurons from human stem cells. *J Neurosci*, 33, 574-586.
- Bensimon, G., Lacomblez, L., and Meininger, V. (1994). A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med*, 330, 585-591.
- Bilican, B., Serio, A., Barmada, S.J., Nishimura, A.L., Sullivan, G.J., Carrasco, M., Phatnani, H.P., Puddifoot, C.A., Story, D., Fletcher, J., Park, I.H., Friedman, B.A., Daley, G.Q., Wyllie, D.J., Hardingham, G.E., Wilmot, I., Finkbeiner, S., Maniatis, T., Shaw, C.E., and Chandran, S. (2012). Mutant induced pluripotent stem cell lines recapitulate aspects of TDP-43 proteinopathies and reveal cell-specific vulnerability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109, 5803-5808.
- Boillée, S., Vande Velde, C., and Cleveland, D.W. (2006). ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron*, 52, 39-59.
- Boza-Moran, M.G., Martinez-Hernandez, R., Bernal, S., Wanisch, K., Also-Rallo, E., Le Heron, A., Alias, L., Denis, C., Girard, M., Yee, J.K., Tizzano, E.F., and Yáñez-Muñoz, R.J. (2015). Decay in survival motor neuron and plastin 3 levels during differentiation of iPSC-derived human motor neurons. *Sci Rep*, 5, 11696.
- Burkhardt, M.F., Martinez, F.J., Wright, S., Ramos, C., Volfson, D., Mason, M., Garnes, J., Dang, V., Lievers, J., Shoukat-Mumtaz, U., Martinez, R., Gai, H., Blake, R., Vaisberg, E., Grskovic, M., Johnson, C., Irion, S., Bright, J., Cooper, B., Nguyen, L., Griswold-Prenner, I., and Javaherian, A. (2013). A cellular model for sporadic ALS using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Mol Cell Neurosci*, 56, 355-364.
- Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPSC cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol*, 27, 275-280.
- Chen, H., Qian, K., Du, Z., Cao, J., Petersen, A., Liu, H., Blackbourn, L.W.4th., Huang, C.L., Errigo, A., Yin, Y., Lu, J., Ayala, M., and Zhang, S.C. (2014). Modeling ALS with iPSCs Reveals that Mutant SOD1 Misregulates Neurofilament Balance in Motor Neurons. *Cell Stem Cell*, 14, 796-809.
- Chestkov, I.V., Vasilieva, E.A., Illarioshkin, S.N., Lagarkova, M.A., and Kiselev, S.L. (2014). Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells for SOD1-Associated Amyotrophic Lateral Sclerosis Pathogenesis Studies. *Acta Naturae*, 6, 54-60.
- Corti, S., Nizzardo, M., Simone, C., Falcone, M., Nardini, M., Ronchi, D., Donadoni, C., Salani, S., Riboldi, G., Magri, F., Menozzi G., Bonaglia C., Rizzo F., Bresolin N., and Comi G.P. (2012). Genetic correction of human induced pluripotent stem cells from patients with spinal muscular atrophy. *Sci Transl Med*, 4, 165ra162.
- Dimos, J.T., Rodolfa, K.T., Niakan, K.K., Weisenthal, L.M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G.F., Saphier, G., Leibel, R., Goland, R., Menozzi, G., Bonaglia, C., Rizzo, F., Bresolin, N., and Comi, G.P. (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, 321, 1218-1221.

- Donnelly, C.J., Zhang, P.W., Pham, J.T., Heusler, A.R., Mistry, N.A., Vidensky, S., Daley, E.L., Poth, E.M., Hoover, B., Fines, D.M., Maragakis, N., Tienari, P.J., Petrucelli, L., Traynor, B.J., Wang, J., Rigo, F., Bennett, C.F., Blackshaw, S., Sattler, R., and Rothstein, J.D. (2013). RNA toxicity from the ALS/FTD C9ORF72 expansion is mitigated by antisense intervention. *Neuron*, 80, 415-428.
- Douvaras, P., and Fossati, V. (2015). Generation and isolation of oligodendrocyte progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*, 10, 1143-1154.
- Ebert, A.D., Yu, J., Rose, F.F., Jr., Mattis, V.B., Lorson, C.L., Thomson, J.A., and Svendsen, C.N. (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, 457, 277-280.
- Egawa, N., Kitaoka, S., Tsukita, K., Naitoh, M., Takahashi, K., Yamamoto, T., Adachi, F., Kondo, T., Okita, K., Asaka, I., Aoi, T., Watanabe, A., Yamada, Y., Morizane, A., Takahashi, J., Ayaki, T., Ito, H., Yoshikawa, K., Yamawaki, S., Suzuki, S., Watanabe, D., Hioki, H., Kaneko, T., Makioka, K., Okamoto, K., Takuma, H., Tamaoka, A., Hasegawa, K., Nonaka, T., Hasegawa, M., Kawata, A., Yoshida, M., Nakahata, T., Takahashi, R., Marchetto, M.C., Gage, F.H., Yamanaka, S., and Inoue, H. (2012). Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci Transl Med*, 4, 145ra104.
- Farrar, M.A., and Kiernan, M.C. (2015). The Genetics of Spinal Muscular Atrophy: Progress and Challenges. *Neurotherapeutics*, 12, 290-302.
- Haeusler, A.R., Donnelly, C.J., Periz, G., Simko, E.A., Shaw, P.G., Kim, M.S., Maragakis, N.J., Troncoso, J.C., Pandey, A., Sattler, R., Rothstein, J.D., and Wang, J. (2014). C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease. *Nature*, 507, 195-200.
- Han, S.S., Williams, L.A., and Eggan, K.C. (2011). Constructing and deconstructing stem cell models of neurological disease. *Neuron*, 70, 626-644.
- Hu, B.Y., and Zhang, S.C. (2009). Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells. *Nat Protoc*, 4, 1295-1304.
- Japtok, J., Lojewski, X., Naumann, M., Klingenstein, M., Reinhardt, P., Sternecker, J., Putz, S., Demestre, M., Boeckers, T.M., Ludolph, A.C., Liebau, S., Storch, A., Hermann, A. (2015). Stepwise acquirement of hallmark neuropathology in FUS-ALS iPSC models depends on mutation type and neuronal aging. *Neurobiol Dis*, 82, 420-429.
- Kim, D.S., Lee, J.S., Leem, J.W., Huh, Y.J., Kim, J.Y., Kim, H.S., Park, I.H., Daley, G.Q., Hwang, D.Y., and Kim, D.W. (2010). Robust enhancement of neural differentiation from human ES and iPSC cells regardless of their innate difference in differentiation propensity. *Stem Cell Rev*, 6, 270-281.
- Kiskinis, E., Sandoe, J., Williams, L.A., Boulting, G.L., Moccia, R., Wainger, B.J., Han, S., Peng, T., Thams, S., Mikkilineni, S., Mellin, C., Merkle, F.T., Davis-Dusenbery, B.N., Ziller, M., Oakley, D., Ichida, J., Di Costanzo, S., Atwater, N., Maeder, M.L., Goodwin, M.J., Nemesh, J., Handsaker, R.E., Paull, D., Noggle, S., McCarroll, S.A., Joung, J.K., Woolf, C.J., Brown, R.H., and Eggan, K. (2014). Pathways Disrupted in Human ALS Motor Neurons Identified through Genetic Correction of Mutant SOD1. *Cell Stem Cell*, 14, 781-795.
- Lenzi, J., De Santis, R., de Turreis, V., Morlando, M., Laneve, P., Calvo, A., Caliendo, V., Chio, A., Rosa, A., and Bozzoni, I. (2015). ALS mutant FUS proteins are recruited into stress granules in induced pluripotent stem cell-derived motoneurons. *Dis Model Mech*, 8, 755-766.
- Liu, H., Lu, J., Chen, H., Du, Z., Li, X.J., and Zhang, S.C. (2015). Spinal muscular atrophy patient-derived motor neurons exhibit hyperexcitability. *Sci Rep*, 5, 12189.
- Liu, X., Chen, J., Liu, W., Li, X., Chen, Q., Liu, T., Gao, S., and Deng, M. (2015). The fused in sarcoma protein forms cytoplasmic aggregates in motor neurons derived from integration-free induced pluripotent stem cells generated from a patient with familial amyotrophic lateral sclerosis carrying the FUS-P525L mutation. *Neurogenetics*, 16, 223-231.
- Maury, Y., Come, J., Piskorowski, R.A., Salah-Mohellibi, N., Chevalere, V., Peschanski, M., Martinat, C., and Nedelec, S. (2015). Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes. *Nat Biotechnol*, 33, 89-96.
- McGivern, J.V., Patitucci, T.N., Nord, J.A., Barabas, M.E., Stucky, C.L., and Ebert, A.D. (2013). Spinal muscular atrophy astrocytes exhibit abnormal calcium regulation and reduced growth factor production. *Glia*, 61, 1418-1428.
- Miller, T.M., Pestronk, A., David, W., Rothstein, J., Simpson, E., Appel, S.H., Andres, P.L., Mahoney, K., Allred, P., Alexander, K., Ostrow, L.W., Schoenfeld, D., Macklin, E.A., Norris, D.A., Manousakis, G., Crisp, M., Smith, R., Bennett, C.F., Bishop, K.M., and Cudkovicz, M.E. (2013). An antisense oligonucleotide against SOD1 delivered intrathecally for patients with SOD1 familial amyotrophic lateral sclerosis: a phase 1, randomised, first-in-man study. *Lancet Neurol*, 12, 435-442.
- Naryshkin, N.A., Weetall, M., Dakka, A., Narasimhan, J., Zhao, X., Feng, Z., Ling, K.K., Karp, G.M., Qi, H., Woll, M.G., Chen, G., Zhang, N., Gabbeta, V., Vazirani, P., Bhattacharyya, A., Furia, B., Risher, N., Sheedy, J., Kong, R., Ma, J., Turpoff, A., Lee, C.S., Zhang, X., Moon, Y.C., Trifillis, P., Welch, E.M., Colacino, J.M., Babiak, J., Almstead, N.G., Peltz, S.W., Eng, L.A., Chen, K.S., Mull, J.L.,

- Lynes, M.S., Rubin, L.L., Fontoura, P., Santarelli, L., Haehnke, D., McCarthy, K.D., Schmucki, R., Ebeling, M., Sivaramakrishnan, M., Ko, C.P., Paushkin, S.V., Ratni, H., Gerlach, I., Ghosh, A., and Metzger, F. (2014). Motor neuron disease. SMN2 splicing modifiers improve motor function and longevity in mice with spinal muscular atrophy. *Science*, 345, 688-693.
- Ng, S.Y., Soh, B.S., Rodriguez-Muela, N., Hendrickson, D.G., Price, F., Rinn, J.L., and Rubin, L.L. (2015). Genome-wide RNA-Seq of Human Motor Neurons Implicates Selective ER Stress Activation in Spinal Muscular Atrophy. *Cell Stem Cell*, 17, 569-584.
- Nishimura, A.L., Shum, C., Scotter, E.L., Abdelgany, A., Sardone, V., Wright, J., Lee, Y.B., Chen, H.J., Bilican, B., Carrasco, M., Maniatis, T., Chandran, S., Rogelj, B., Gallo, J.M., and Shaw, C.E. (2014). Allele-specific knockdown of ALS-associated mutant TDP-43 in neural stem cells derived from induced pluripotent stem cells. *PLoS One*, 9, e91269.
- Ogawa, S., Tokumoto, Y., Miyake, J., and Nagamune, T. (2011). Induction of oligodendrocyte differentiation from adult human fibroblast-derived induced pluripotent stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 47, 464-469.
- Qu, Q., Li, D., Louis, K.R., Li, X., Yang, H., Sun, Q., Crandall, S.R., Tsang, S., Zhou, J., Cox, C.L., Cheng, J., and Wang, F. (2014). High-efficiency motor neuron differentiation from human pluripotent stem cells and the function of Islet-1. *Nat Commun*, 5, 3449.
- Sareen, D., Ebert, A.D., Heins, B.M., McGivern, J.V., Ornelas, L., and Svendsen, C.N. (2012). Inhibition of apoptosis blocks human motor neuron cell death in a stem cell model of spinal muscular atrophy. *PLoS One*, 7, e39113.
- Sareen, D., O'Rourke, J.G., Meera, P., Muhammad, A.K., Grant, S., Simpkinson, M., Bell, S., Carmona, S., Ornelas, L., Sahabian, A., Gendron, T., Petrucelli, L., Baughn, M., Ravits, J., Harms, M.B., Rigo, F., Bennett, C.F., Otis, T.S., Svendsen, C.N., and Baloh, R.H. (2013). Targeting RNA foci in iPSC-derived motor neurons from ALS patients with a C9ORF72 repeat expansion. *Sci Transl Med*, 5, 208ra149.
- Serio, A., Bilican, B., Barmada, S.J., Ando, D.M., Zhao, C., Siller, R., Burr, K., Hagi, G., Story, D., Nishimura, A.L., Carrasco, M.A., Phatnani, H.P., Shum, C., Wilmut, I., Maniatis, T., Shaw, C.E., Finkbeiner, S., and Chandran, S. (2013). Astrocyte pathology and the absence of non-cell autonomy in an induced pluripotent stem cell model of TDP-43 proteinopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110, 4697-4702.
- Su, X.W., Broach, J.R., Connor, J.R., Gerhard, G.S., and Simmons, Z. (2014). Genetic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: implications for clinical practice and research. *Muscle Nerve*, 49, 786-803.
- Toli, D., Buttigieg, D., Blanchard, S., Lemonnier, T., Lamotte d'Incamps, B., Bellouze, S., Baillat, G., Bohl, D., and Haase, G. (2015). Modeling amyotrophic lateral sclerosis in pure human iPSC-derived motor neurons isolated by a novel FACS double selection technique. *Neurobiol Dis*, 82, 269-280.
- Vatovec, S., Kovanda, A., and Rogelj, B. (2014). Unconventional features of C9ORF72 expanded repeat in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *Neurobiol Aging*, 35, 2421, 2421.e1-2421e12.
- Wirth, B., Barkats, M., Martinat, C., Sendtner, M., and Gillingwater, T.H. (2015). Moving towards treatments for spinal muscular atrophy: hopes and limits. *Expert Opin Emerg Drugs*, 20, 353-356.
- Yang, Y.M., Gupta, S.K., Kim, K.J., Powers, B.E., Cerqueira, A., Wainger, B.J., Ngo, H.D., Rosowski, K.A., Schein, P.A., Ackeifi, C.A., Arvanites, A.C., Davidow, L.S., Woolf, C.J., and Rubin, L.L. (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, 713-726.
- Yoshida, M., Kitaoka, S., Egawa, N., Yamane, M., Ikeda, R., Tsukita, K., Amano, N., Watanabe, A., Morimoto, M., Takahashi, J., Hosoi, H., Nakahata, T., Inoue, H., and Saito, M.K. (2015). Modeling the early phenotype at the neuromuscular junction of spinal muscular atrophy using patient-derived iPSCs. *Stem Cell Rep*, 4, 561-568.