université PARIS-SACLAY

Développement d'un test de criblage à haut débit basé sur les cellules souches pluripotentes permettant d'identifier des modulateurs de la neurogenèse dopaminergique chez l'Homme. Les voies dépendantes des purines et la Maladie de Lesch-Nyhan comme preuve de principe.

Development of a high-throughput screening assay based on pluripotent stem cells to identify modulators of dopaminergic neurogenesis in humans. Purine-dependent pathways and Lesch-Nyhan disease as proof of principle.

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569 : innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)
Spécialité de doctorat : Physiologie et physiopathologie
Graduate School : Santé et médicaments
Référent : Université d'Évry Val d'Essonne

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Institut des Cellules souches pour le traitement et l'étude des maladies monogéniques (Université Paris-Saclay, Inserm, Univ Evry)**

Sous la direction de **Alexandra BENCHOUA**, Directrice de recherche CECS/I-STEM

Thèse soutenue à Corbeil-Essonnes, le 23 mai 2023, par

Marie LASBAREILLES

Composition du Jury

Bruno COLOMBO PR, Université d'Evry Val d'Essonne	Président
Delphine BOHL PhD, CR INSERM, Institut du Cerveau, Paris	Rapporteur
Vincent EL GHOUZZI PhD, CR INSERM, Hôpital Robert Debré, Paris	Rapporteur
François COUDORE PU-PH, INSERM, Université Paris-Saclay	Examinateur
Elaine DEL NERY PhD, Institut Curie, Paris	Examinatrice
Delphine JOSEPH PR, UMR CNRS, Université Paris-Saclay	Examinatrice

THESE DE DOCTORAT

NNT : 2023UPASQ020

université PARIS-SACLAY
ÉCOLE DOCTORALE
Innovation thérapeutique du fondamental à l'appliqué (ITFA)

Titre : Développement d'un test de criblage à haut débit basé sur les cellules souches pluripotentes permettant d'identifier des modulateurs de la neurogenèse dopaminergique chez l'Homme. Les voies dépendantes des purines et la Maladie de Lesch-Nyhan comme preuve de principe.

Mots clés : Cellules souches pluripotentes humaines. Neurones dopaminergiques. Criblage à haut débit. Voies purinergiques. Maladie de Lesch-Nyhan

Résumé : Les neurones dopaminergiques du système nerveux central sont principalement localisés dans une région du cerveau appelée le mésencéphale ventral. Ils sont divisés en plusieurs sous-groupes projetant sur différentes structures du cerveau formant ainsi les voies dopaminergiques. Ces voies sont impliquées dans la réalisation de fonctions physiologiques essentielles telles que le contrôle moteur, la mémoire, la cognition, le système de récompense ou encore les émotions. Les altérations du développement de ces neurones peuvent conduire à l'apparition de pathologies potentiellement sévères comme des troubles moteurs, des pathologies neurodégénératives ou neuropsychiatriques. C'est le cas de la maladie de Lesch-Nyhan, une pathologie neurodéveloppementale rare causée par la mutation du gène HPRT1 conduisant à un déficit total ou partiel d'une enzyme clé dans la voie de recyclage des purines : l'HGPRT.

Afin de pouvoir explorer les mécanismes à l'origine du développement des neurones dopaminergiques et des pathologies les impliquant, les cellules souches pluripotentes humaines se sont avérées être un modèle in vitro intéressant. Ces dernières années, plusieurs protocoles ont été développés afin de modéliser le développement des neurones dopaminergiques et de leurs progéniteurs à partir de ces cellules, en particulier dans le cadre de la recherche sur la maladie de Parkinson. Au cours de ma thèse, j'ai adapté ces protocoles afin de réaliser la différenciation des progéniteurs du mésencéphale dans un format miniaturisé adapté au criblage à haut débit de petites molécules de façon systématique.

J'ai ensuite criblé une banque de molécules afin de chercher à identifier des composés potentiels permettant d'augmenter la neurogénèse des progéniteurs dopaminergiques du mésencéphale ventral comme preuve de principe de ce test. Etant donnée l'implication des neurones dopaminergiques dans la maladie de Lesch-Nyhan et du rôle potentiel des purines dans le développement du cerveau, une banque contenant des ligands purinergiques et des voies dépendantes de l'adénosine a été choisie. Ce criblage m'a permis d'identifier un agoniste du récepteur A3 à l'adénosine comme candidat potentiel. Ce composé s'est avéré efficace pour augmenter le taux de progéniteurs compétents pour la différenciation en neurones dopaminergiques à partir de CSP saines. Il a aussi permis de corriger le défaut de genèse des neurones dopaminergiques lié à la perte de fonction de l'HGPRT dans une lignée de CSP modèle de la maladie de Lesch-Nyhan.

Le développement d'un tel test ouvre la voie pour le criblage de plus larges banques de molécules pour l'optimisation du protocole et la recherche de traitement pour des pathologies neurodéveloppementales comme la LND ou, à plus grande échelle, impliquant les nDA. Les résultats obtenus à l'issu de ces travaux nous permettraient également d'explorer le rôle du récepteur à l'adénosine ciblé par le composé dans la mise en place des nDA et son implication potentielle dans la maladie de Lesch-Nyhan.

Title: Development of a high-throughput screening assay based on pluripotent stem cells to identify modulators of dopaminergic neurogenesis in humans. Purine-dependent pathways and Lesch-Nyhan disease as proof of principle.

Keywords: Human pluripotent stem cells. Dopaminergic neurons. High-throughput screening. Purinergic pathways. Lesch-Nyhan disease.

Abstract: Dopamine neurons of the central nervous system are mainly located in the ventral midbrain. They are divided into several subgroups projecting to different brain structures, forming the dopaminergic pathways. These pathways are involved in essential physiological functions such as motor control, memory, cognition, reward system and emotion. Developmental alterations of these neurons can lead to potentially severe pathologies such as motor disorders, neurodegenerative or neuropsychiatric diseases. Among them, Lesch-Nyhan disease represent a rare neurodevelopmental disorder caused by mutation of the *HPRT1* gene leading to total or partial loss of a key enzyme in the purine salvage pathway: HGPRT.

To explore the mechanisms underlying the development of dopaminergic neurons and the pathologies involving them, human pluripotent stem cells have proven to be an interesting in vitro model. To elucidate the pathway involved in the genesis of DA neurons, the implementation of a high-throughput screening test based on human pluripotent stem cells to identify modulators of dopaminergic neurogenesis was envisaged. In the past few years, several protocols have been developed to model the development of dopaminergic neurons starting from these cells, especially in the context of research on Parkinson's disease. During my PhD thesis, I modified these protocols to allow the differentiation of dopaminergic progenitors in a miniaturized format adapted to high-throughput screening of small molecules in a systematic way.

I then screened a library of molecules to identify potential compounds to increase the neurogenesis of ventral midbrain dopaminergic progenitors as a proof of principle for this test. Given the involvement of dopaminergic neurons in Lesch-Nyhan disease and the potential role of purines in brain development, a library containing purinergic ligands and adenosine-dependent pathways was chosen. This screening allowed me to identify an adenosine A3 receptor agonist as a potential candidate. This compound showed efficiency at increasing the production of progenitors competent to the differentiation in dopaminergic neurons from healthy PSC. It also corrected the default of genesis of dopaminergic neurons induced by HGPRT loss of function in a PSC line model of Lesch-Nyhan disease.

The development of such an assay paves the way for the screening of larger molecules libraries for protocol optimization or therapeutic research for neurodevelopmental pathologies such as LND or, on a larger scale, involving nDA. The results obtained from this work would also allow us to explore the role of the adenosine receptor targeted by the compound in the nDA establishment and its potential involvement in Lesch-Nyhan disease.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier Marc Peschanski, Cécile Martinat, Raymond Zakhia et maintenant Yann Guivarch pour m'avoir accueillie à I-Stem. Grâce à eux, j'ai pu à travers mes stages et ma thèse au sein de l'institut, évoluer dans un environnement scientifique enrichissant et de qualité.

Je voudrais également remercier les membres du Jury : le professeur Colombo pour avoir accepté d'en être le président et examinateur, les docteurs El Ghouzzi et Bohl pour en être les rapporteurs, les professeurs Joseph et Coudoré ainsi que le docteur Del Nery pour en être les examinateurs.

Merci au laboratoire I-Stem et à l'Agence de biomédecine pour l'aspect financier de ces travaux.

Je tiens ensuite à remercier tout particulièrement Alexandra Benchoua, qui après avoir encadré mes précédents stages, m'a permis de continuer sur ce projet en acceptant d'être ma directrice de thèse au sein de l'équipe Neuroplasticité et thérapeutiques.

Mes remerciements vont ensuite à l'équipe Neuroplasticité et thérapeutiques, pour leur accueil, leur accompagnement et leurs conseils tout au long de ma thèse. Je n'aurais pas souhaiter une meilleure équipe pour ces trois ans, et un peu plus… Un grand, très grand merci à Claire pour tout son travail et son accompagnement, une page ne serait pas assez ! Merci aussi aux filles de l'équipe Laure, Thifaine et Lise. Merci aussi aux anciens : Valentin, Louise, Benjamin pour tous les bons moments passés dans le secteur 3.

Mes prochains remerciements vont aux différentes plateformes de l'institut qui ont permis la réalisation de ce projet. D'abord, un grand merci à Johana de la plateforme HTS. Je souhaiterais également remercier les anciens de la plateforme, Gurvan et Alexandre. Merci de votre accompagnement pour ce projet de criblage, mais surtout merci d'avoir été patients lors de mes appels de détresse au BRAVO. Ensuite, un grand merci à Jérôme et Céline de la plateforme d'imagerie pour tous leurs conseils. Grâce à eux le CX7 n'a plus de secrets pour moi. Merci aussi à Karine et Lina de la plateforme de biologie cellulaire pour les contrôles-qualités des cellules.

Je souhaiterais maintenant remercier mes autres collègues. Ces années passées à I-Stem m'ont permis de rencontrer de belles personnes, depuis mon arrivée jusqu'à la fin de mon doctorat, en commençant par les anciens de l'équipe des stagiaires : Florine, Manon, Camille, Alexandre et Axel. Merci aussi à l'équipe des « -ine » : Pauline, Adeline et Florine (encore) pour les bons moments et les fous rires au labo ou ailleurs. Merci à tous ceux déjà cités ou non pour les moments sportifs, que ce soit le groupe escalade ou les randonneurs. Merci également aux filles de motoneurones, Azania j'ai hâte de venir applaudir à ta thèse, qui je suis sûre sera incroyable.

Pour finir je souhaiterais conclure ces remerciements professionnels en remerciant toutes les personnes avec qui j'ai pu échanger au cours de ces dernières années à l'institut ainsi que toutes celles qui ont contribué de près ou de loin à ce projet.

Enfin, mes derniers remerciements vont à ma famille et mes proches pour leur soutien sans faille tout au long de mon parcours professionnel dans les bons moments et ceux plus difficiles.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS **4**
Table des matières **6**
Index des figures et des tableaux **9**
Abréviations **13**
Introduction **16**
Chapitre 1 : Les neurones dopaminergiques 16
1. Les neurones dopaminergiques du système nerveux central 16
1.1. Généralités 16
Fonction : synthèse d'un neurotransmetteur, la dopamine 16
Stockage et transport de la DA 17
Transmission et dégradation 18
Les récepteurs à la dopamine 20
1.2. Les voies dopaminergiques 23
Localisation dans le SNC 23
Les sous-groupes dopaminergiques 23
Les voies de projection des neurones DA 24
2. Mise en place des neurones dopaminergiques au cours du développement 26
2.1. Formation du tube neural 27
2.2. Régionalisation du tube neural et spécification du mésencéphale ventral 28
Etablissement du mésencéphale et de la MBH le long axe AP 29
Positionnement du MV selon l'axe DV 31
2.3. Spécification des progéniteurs dopaminergiques du MV 32
2.4. Différenciation et maintien des neurones DA 33
Différenciation en nDA 33
Maintien des nDA matures 34
Sous spécification des différents groupes de nDA 37
3. Les pathologies impliquant les nDA et leur signalisation 40
3.1. Les pathologies neurodégénératives 41
La maladie de Parkinson 41
3.2. Les dystonies 43
3.3. Les troubles neuropsychiatriques 43
Le syndrome de Gilles de la Tourette (SGT) 43
La schizophrénie 44
Le trouble du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité (TDAH) 45
Autres exemples de troubles neuropsychiatriques et phénomènes d'addiction 45
Chapitre 2 : Les cellules souches pluripotentes humaines : un outil de modélisation des nDA 47
1. Définitions 47
2. Les deux types de CSPh 47
2.1. Les cellules souches embryonnaires humaines (hESC) 47
Découverte et origine 47
Les cellules souches embryonnaires : une recherche très encadrée 49
2.2. Les cellules souches humaines induites à la pluripotence (hiPSC) 51
3. Les CSPh en culture *in vitro* et leur caractérisation 55
3.1. Culture des CSPh 55
3.2. Caractéristiques des CSPh 57
Pluripotence 57
Contrôle du maintien de l'intégrité génomique 58
4. Les différentes applications des CSPh en recherche 59
4.1. La modélisation physiopathologique 60

4.2. La thérapie cellulaire ... 61
4.3. Le drug screening ... 62
5. Modélisation des nDA à partir de CSPh ... 64
Revue bibliographique ... 68
Chapitre 3 : Implication des neurones DA dans une maladie rare : la maladie de Lesch-Nyhan ... 94
1. La maladie de Lesch-Nyhan (MLN) ... 94
1.1. Découverte de la maladie de Lesch-Nyhan ... 94
1.2. Description clinique de la maladie ... 94
Epidémiologie ... 94
Symptômes généraux ... 94
1.3. Cause de la pathologie : mutation du gène *HPRT1* ... 95
1.4. Les différentes formes de la maladie de Lesch-Nyhan ... 96
1.5. Diagnostic et prise en charge des patients MLN ... 99
Diagnostic de la pathologie ... 99
Pronostic de la maladie ... 100
Traitements ... 100
1.6. La maladie de Lesch-Nyhan : un trouble du métabolisme des purines ... 104
Présentation rapide du métabolisme des purines ... 104
Conséquences du déficit en HGPRT sur le métabolisme des purines ... 104
2. Les nDA dans la maladie de Lesch-Nyhan ... 106
2.1. Analyses biochimiques ... 107
2.2. Imagerie cérébrale ... 108
2.3. Hypothèses sur les causes de la pathologie ... 110
Hypothèse du stress oxydant et des métabolites toxiques ... 110
Implication des voie adénosinergiques et sérotoninergiques ... 111
2.4. Les modèles d'étude de la maladie de Lesch-Nyhan ... 112
Les modèles animaux ... 112
Les modèles cellulaires in vitro ... 114
2.5. Relation entre l'HGPRT et les facteurs déterminant l'identité dopaminergique du MV au cours du développement ... 115
Présentation et rationnel du projet ... 119
Environnement scientifique ... 119
Objectif du projet de thèse ... 122
Matériels et Méthodes ... 123
1. Culture cellulaire ... 123
1.1. Matériel biologique ... 123
1.2. Culture des CSPh : ... 124
1.3. Dérivation des progéniteurs DA du mésencéphale ventral à partir de CSPh ... 124
Induction neurale à partir de CSPh ... 124
Spécification du domaine des progéniteurs neuronaux du MV ... 125
1.4. Différenciation terminale des progéniteurs en neurones DA ... 126
1.5. Contrôles qualités (CQ) des CSPh et des progéniteurs dérivés ... 127
2. Caractérisation des progéniteurs et des neurones matures ... 128
2.1. Immunofluorescence (IF) ... 128
Préparation des cellules ... 128
Marquages primaires ... 129
Marquages secondaires ... 129
3. Expression du récepteur à l'adénosine ADORA3 chez les progéniteurs avant traitement ... 130
Culture des progéniteurs ... 130
Immunofluorescence ... 130
4. Acquisition et quantification des marqueurs ... 132
Marquages des microplaques ... 132

Marquages des µ-Dish 133
5. Criblage dopaminergique 134
5.1. Miniaturisation du protocole 134
5.2. Criblage primaire 136
5.3. Retests en doses-réponses (DR) 136
6. Sélection des composés 137
Critères d'efficacité 137
Acquisition et analyses des données 138
Résultats 139
1. Travaux de recherche inclus en partie dans l'article 144
1.1. Différenciation et miniaturisation des progéniteurs des nDA à partir de CSPh 144
1.2. Résultats du criblage primaire et sélection des hits primaires 151
1.3. Retests des composés en doses-réponses (DR) 154
1.4. Validation du composé sur la différenciation terminale des lignées SA001 « wild-type » et éditée KO HGPRT 157
2. Article de recherche 160
3. Travaux de développement et d'optimisation autour du protocole 181
3.1. Contrôle de la prolifération des progéniteurs en phase d'expansion 183
3.2. Optimisation de l'entrée en différenciation des progéniteurs en neurones : inhibition de la voie de signalisation MEK/ERK 190
3.3. Etude préliminaire de l'expression des récepteurs à l'adénosine dans la lignée PDF01 202
Discussion et Perspectives 206
1. Modulation de la genèse des nDA par un agoniste adénosinergique 206
1.1. Résultats des travaux de thèse 206
1.2. Le Rc à l'adénosine ADORA3 206
1.3. Hypothèses mécanistiques 209
Action sur la libération de la β-caténine 209
Voie de l'adénosine 210
1.4. Purines et neurodéveloppement 211
2. Perspectives et ouverture du test de criblage à haut débit 214
2.1. Criblage à haut débit de composés à potentiel thérapeutique et modélisation 214
2.2. Optimisation et standardisation de protocole dans l'objectif de greffe 215
2.3. Identification de voies de signalisation impliquées dans la mise en place de maladies neuropsychiatriques impliquant les neurones DA 215
Conclusion Générale 218
Annexes 219
Références Bibliographiques 221

INDEX DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1 : Schéma de la synthèse et de la transmission dopaminergique (page 19).

Figure 2 : Schéma simple des deux types de Rc à la DA : les « D1-like » et les « D2-like », et de leur voie de signalisation (page 21).

Figure 3 : Distribution des sous-groupes dopaminergiques du SNC chez le rat (page 24).

Figure 4 : Schéma simplifié des ganglions de la base (page 25).

Figure 5 : Schémas et images de microscopie électronique à balayage de la formation du tube neural lors de la neurulation (page 28).

Figure 6 : Schéma simplifié de l'expression des facteurs influençant la mise en place du domaine des progéniteurs dopaminergiques ventraux du mésencéphale (page 30).

Figure 7 : Schéma des gradients WNT et SHH suivant l'axe DV du tube neural (page 32).

Figure 8 : Représentation schématique de la spécification et la maturation des nDA dans le MV à partir de E9 jusqu'à E15 (page 34).

Figure 9 : Exemple de différences morphologiques et moléculaires chez les nDA (page 38).

Figure 10 : Schéma simplifié des interactions génétiques impliquées dans le développement des nDA du MV chez la souris (page 40).

Figure 11 : Schéma simplifié des trois principales voies dopaminergiques, leurs cibles, leurs rôles physiologiques et leurs implications pathologiques (page 41).

Figure 12 : Schéma et photographie d'un blastocyste au stade 5e jour (page 49).

Figure 13 : Schéma de la reprogrammation de cellules somatiques en cellules pluripotentes par l'approche de transfert nucléaire (page 52).

Figure 14 : Différentes approches utilisées pour la reprogrammation des cellules somatiques en hiPSC (page 54).

Figure 15 : Schéma de la méthode de reprogrammation des cellules somatiques en hiPSC avec les quatre facteurs de Yamanaka et exemples d'applications (page 55).

Figure 16 : Exemple de cellules hESC en culture in vitro (page 57).

Figure 17 : Exemple du contrôle du caractère de pluripotence des CSPh (page 58).

Figure 18 : Applications potentielles des CSPh dans le domaine biomédical (page 60).

Figure 19 : Schéma montrant les essais cliniques existants pour des thérapies dérivées de CSPh en 2020 (page 62).

Figure 20 : Sources de thérapies de remplacement cellulaire testées pour la maladie de Parkinson (page 64).

Figure 21 : Schéma des quatre principales voies de signalisation impliquées dans le développement des nDA (page 66).

Figure 22 : Schéma représentant les principaux protocoles de différenciation des CSPh en progéniteurs des nDA et nDA ainsi que les voies sur lesquelles vont agir les cytokines (Page 67).

Figure 23 : Métabolisme des purines et recyclage par l'HGPRT (page 96).

Figure 24 : Corrélation entre le pourcentage résiduel en enzyme HGPRT et le phénotype clinique de la MLN (page 97).

Figure 25 : Localisation et nature des mutations retrouvées dans une cohorte de 85 patients Lesch-Nyhan (page 98).

Figure 26 : Schéma du spectre clinique de la MLN (page 99).

Figure 27 : Traitements administrés aux patients MLN et leur efficacité à corriger ou moduler les troubles comportementaux et neurologiques de la MLN (page 103).

Figure 28 : Schéma représentant les conséquences du déficit en HGPRT sur le métabolisme des purines (page 105).

Figure 29 : PET-scan de deux patients MLN et de deux individus contrôles du même âge (page 109).

Figure 30 : PET-scan d'un patient MLN et d'un individu contrôle du même âge (page 110).

Figure 31 : Stratégies de recherche appliquées et/ou envisagées de l'équipe Neuroplasticité et thérapeutiques (page 121).

Figure 32 : Protocole du criblage primaire (page 122).

Figure 33 : Exemple d'un contrôle de conformité génotypique des SNP sur le chromosome 2 d'un échantillon de progéniteurs neuroépithéliaux à J15 (page 127).

Figure 34 : Exemple du suivi à l'aide de l'Incucyte® S3 Live-Cell Analysis Instrument de chez Sartorius d'un puits de plaque 384 (page 128).

Figure 35 : Exemples de masques appliqués à des progéniteurs J25 pour une analyse des marquages des progéniteurs dopaminergiques (page 133).

Figure 36 : Exemple d'un puits de plaque 384 puits ensemencé avec des progéniteurs PDF01 J25 au BRAVO pour un contrôle de l'induction (page 135).

Figure 37 : Cinétique d'expression des marqueurs des domaines dopaminergique et sérotoninergique : détermination du temps de lancement optimal (J25) pour la différenciation terminale en neurones d'intérêt (page 141).

Figure 38 : Présentation des clones SA001 édités pour l'HGPRT (Ruillier et al., 2020) (page 143).

Figure 39 : Induction des progéniteurs dopaminergiques à partir de CSPh au format miniaturisé (page 144).

Figure 40 : Photos des différents types cellulaires au cours de l'induction (page 145).

Figure 41 : Contrôle de la qualité de l'ensemencement après la distribution automatisée des cellules au BRAVO (page 146).

Figure 42 : Exemples de masque utilisés pour sélectionner les cellules exprimant les marqueurs d'intérêts : Hoechst, SOX2, EN-1 et FOXA2 (page 147).

Figure 43 : Quantification de la proportion des marquages SOX2, EN-1 et FOXA2 dans les progéniteurs à J25 (page 148).

Figure 44 : Différenciation terminale pendant 28 jours des progéniteurs dopaminergiques J25 en nDA (page 150).

Figure 45 : Protocole du criblage primaire (page 151)

Figure 46 : Run Z-Score et viabilité cellulaire du criblage primaire à 5µM et 20 µM (page 152).

Figure 47 : Pourcentage de progéniteurs dopaminergiques EN-1+/FOXA2+ (J25) après traitements avec les hits primaires (page 153).

Figure 48 : Doses-réponses sur les quatre lignées « wild-type » avec les composés sélectionnés lors du criblage primaire (page 155).

Figure 49 : Immunofluorescences des progéniteurs dopaminergiques à J25 avec et sans traitement avec le C08 à 10µM (page 156).

Figure 50 : Validation de l'expression du Rc A3 chez les progéniteurs neuroépithéliaux J16 (page 157).

Figure 51 : Différenciation terminale en neurones des progéniteurs J25 à partir de la lignée SA001 « wild-type » ou éditée KO HGPRT au préalable traités ou non avec le C08 (page 158).

Figure 52 : Effet du C08 sur l'expression des marqueurs dopaminergiques chez les progéniteurs SA001 J25 « wild-type » et KO HGPRT avant différenciation terminale (page 159).

Figure 53 : Différenciation terminale des clones SA001 en nDA à partir des progéniteurs J25 traités ou non avec le C08 (page 160).

Figure 54 : Observations faites lors de la différenciation terminale des progéniteurs (page 182).

Figure 55 : Test des densités cellulaires d'ensemencement en T25 à J15 (page 184).

Figure 56 : Test de retrait de l'EGF du mix de cytokines (retrait entre J15 et J25) (page 186).

Figure 57 : Immunofluorescences du test de retrait de l'EGF du mix de cytokines pendant l'amplification (page 188).

Figure 58 : Quantification des marqueurs du domaine des progéniteurs dopaminergiques du MV à J25 avec retrait de l'EGF du mix de cytokines pour les lignées PDF01 et SA001 (page 189).

Figure 59 : Schéma du protocole de différenciation terminale avec l'inhibiteur de la voie MEK1/2 pendant 48 heures (page 191).

Figure 60 : Suivi de la différenciation terminale des neurones avec ou sans inhibiteur de la voie MEK1/2 (page 192).

Figure 61 : Immunofluorescences de l'expression des marqueurs des nDA à J28 de différenciation dans la lignée PDF01 avec et sans traitement par l'inhibiteur MEK1/2 à 0,05mM (page 193).

Figure 62 : Schéma du protocole de différenciation terminale avec traitement à plusieurs concentrations avec l'inhibiteur de MEK1/2 (page 194).

Figure 63 : Résultats du test de concentration de l'inhibiteur de la voie MEK1/2 pendant la différenciation terminale (1/2) (page 197).

Figure 64 : Résultats du test de concentration de l'inhibiteur de la voie MEK1/2 pendant la différenciation terminale (2/2) (page 199).

Figure 65 : Immunofluorescences des neurones J28 après traitements avec l'inhibiteur de MEK1/2 pendant différents temps (1/2) (page 201).

Figure 66 : Immunofluorescences des neurones J28 après traitements avec l'inhibiteur de MEK1/2 pendant différents temps (2/2) (page 202).

Figure 67 : Etude de l'expression des protéines ADORA par IF sur les progéniteurs J16 de la lignée PDF01 (page 204).

Figure 68 : Structure du composé 08 et de l'adénosine (page 206).

Figure 69 : Schéma représentant le transport de l'adénosine et ses Rc (page 207).

Figure 70 : Schéma simplifié des voies de signalisation agissant sur la β-caténine lors de l'activation du Rc par un angoniste A3 (page 210).

Tableau 1 : Résumé des caractéristiques des récepteurs à la dopamine (page 22).

Tableau 2 : Mutations génétiques affectant les différents facteurs et leurs conséquences sur le développement des nDA du MV (page 36).

Tableau 3 : Mesure de la fonctionnalité des nDA dans différentes structures cérébrales de patients LND et de contrôles (page 108).

Tableau 4 : Nom et caractéristiques des différentes lignées de CSPh utilisées pour les travaux de recherche (page 123).

Tableau 5 : Récapitulatif des anticorps utilisés pour les marquages primaires et secondaires réalisés aux cours des travaux de thèse (page 132).

Tableau 6 : Tableau des hits primaires issus du criblage sur la lignée PDF01 (page 154).

Tableau S1 : Caractéristiques des ligands adénosinergiques (composés 1 à 51) de la banque Screen-Well® Neurotransmitter Library (Purinergic and Adenosine Ligands) de chez Enzo Life Sciences (page 219).

Tableau S2 : Caractéristiques des ligands purinergiques (composés 52 à 73) de la banque Screen-Well® Neurotransmitter Library (Purinergic and Adenosine Ligands) de chez Enzo Life Sciences (page 220).

ABREVIATIONS

AADC : Décarboxylase des acides L-aminés aromatique

AA2P : Acide ascorbique 2-phosphate

ABM : Agence de la Biomédecine

AC : Adénylate cyclase

ADP : Adénosine diphosphate

ADSL : Adénylosuccinate lyase

AFM : Association Française contre les Myopathies

AICAR : 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide

ALDH : Aldéhyde déshydrogénase

AMP : Adénosine monophosphate

AMPK : kinase activée par l'AMP

AP : Antéro-postérieur

APRT : Adénine phosphoribosyltransférase

ARN : Acide ribonucléique

Ascl1 : Achaete-scute homolog 1

ATP : Adénosine triphosphate

A1 : ADORA1

A2A : ADORA2A

A2B : ADORA2B

A3 : ADORA3

BDNF : Facteur neurotrophique issu du cerveau

BH_4 : Tétrahydrobioptérine

BMP : Bone morphogenetic proteins

BSA : Albumine de sérum bovin

CECS : Centre d'étude des cellules souches

CLB : Calbindine

CNV : Copy number variation

COMT : Catéchol-O-méthyltransférase

CQ : Contrôle qualité

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CSP(h) : Cellules souches pluripotentes (humaines)

DA : Dopamine

DAPT : N-[N-(3, 5-difluorophenacetyl)-1-alanyl]-S-Phenylglycinet-butylester

DARPP32 : Phosphoprotéine de 32 Kda régulée par la dopamine

DAT : Transporteur de la dopamine

DMD : Dystrophie musculaire de Duchenne

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DOPA : 3,4-dihydroxyphénylalanine

DOPAC : Acide 3,4-dihydroxyphénylacétique

DOPAL : 3,4-dihydroxyphénylacétaldéhyde

DPI : Diagnostic pré-implantatoire

DR : Doses-réponses

DV : Dorso-ventral

$D_{1\text{-}5}$: Récepteurs à la dopamine 1-5

D_2S/L : D_2 forme courte/longue

EB : Corps embryoïde

EDTA : Acide éthylène-diamine-tétra-acétique

EGF : Facteur de croissance épidermique

EN-1/2 : Engrailed 1/2

FAICAR : 5-formamidoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide

FGF : Facteur de croissance des fibroblastes

FOXA2 : Forkhead box A2

FP : Floor plate

GABA : Acide γ-aminobutyrique

GBX2 : Gastrulation Brain Homeobox 2

Girk2 : Canal de rectification potassique 2 régulé par une protéine G

GDNF : Facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales

GDP : Guanosine diphosphate

GLI : Glioma-associated Oncogene

GMP : Guanosine monophosphate

GMP* : Good manufacturing practices

Gpe/i : Globus pallidus externe/interne

GTP : Guanosine triphosphate

GSK3-3β : Glycogène synthase kinase-3β

HCS : High content screening/ imagerie à haut contenu

(h)ESC : Cellules souches embryonnaires (humaines)

hiPSC : Cellules souches humaines induites à la pluripotence

HGPRT : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transférase

HND : Hyperuricémies associées à des troubles neurologiques

HPRT1 : Hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1

HRH : Hyperuricémies liées à l'HPRT

HTS : High throughput screening/ criblage à haut débit

HuCD : Protéines neurale Hu C et D

HVA : Acide homovanillique

IMP : Inosine monophosphate

Inserm : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

IF : Immunofluorescence

IsO : Organisateur isthmique

I-Stem : Institut des cellules souches pour le traitement et l'étude des maladie monogénique

KO : Knock-out

Lam : Laminine

LIF : Leukemia inhibitory factor

Lmx1a/b : LIM homeobex 1a/b

MAO : Monoamine oxydase

MCI : Masse cellulaire interne

MEF : Fibroblastes embryonnaires murins

MHB : Midbrain-hindbrain boundary

MLN : Maladie de Lesch-Nyhan

MPTP : 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine

mRNA : ARN messager

MSN : Neurones moyens épineux

Msx1 : Homéobox Msh 1

MV : Mésencéphale ventral

nDA : Neurones dopaminergiques

Ngn2 : Neurogénine 2

NGS : Next-generation sequencing/ séquençage à haut débit

Nkx2.2 : NK2 Homeobox 2

NOLZ1 : protéine en doigt de zinc 503, ZFP503

(h)NSC : Cellules souches neurales (humaines)

NURR1 : Nuclear receptor-related factor 1

NR : Noyau rouge

NT2/D1 : NTERA-2 clone D1

OC : Oculomoteur

OTX2 : Orthodenticle Homeobox 2

PAX2 : Paired box 2

PBS : Phosphate buffered saline

PET : Tomographie par émission de positons

PFA : Paraformaldéhyde

Pitx3 : Paired like homeodomain 3

PO : Poly-L-Ornithine

PPI : Protéine phosphatase-1

PRPP : Phosphoribosylpyrophosphate

PZS : Plate z-score

Rc : Récepteur

RP : Roof plate

RRA : Aire rétrorubrale

SAG : Agoniste du récepteur Smoothened (Smo) aux morphogènes Hedgehog (Hh)

SAH : S-adénosylhomocystéine

SAICAR : Succinylaminoimidazole-carboxamide riboside

SAM : S-adénosylméthionine

SAU : Surproduction en acide urique

SGT : Syndrome de Gilles de la Tourette

SHANK3 : SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3

SHH : Sonic hedgehog

SLN : Syndrome de Lesch-Nyhan

SMAD : Supresseurs des « Mothers against decapentaplegic »

SNC : Système nerveux central

SNP : Single Nucleotide Polymorphisms

SNpc : Substancia nigra pars compacta

SNpr : Substancia nigra pars reticulata

SOX2/6 : SRY-Box Transcription Factor 2/6

SVF : Sérum de veau fœtal

Rc : Récepteur

ROCK : Rho-associated kinase

RZS : Run z-score

TDAH : Trouble du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité

TGFβ : Transforming growth factor β

TH : Tyrosine hydroxylase

TPH2 : Tryptophane hydroxylase 2

UMR : Unité mixte de recherche

VLN : Variant Lesch-Nyhan

VMAT2 : Transporteur vésiculaire de monoamines 2

VTA : Aire tegmentale ventrale

VTN : Vitronectine

WNT : Wingless integration site

ZTP : Nucléotides Z

3-MT : 3-méthoxytyramine

5-HT : Sérotonine ou 5 hydroxytryptamine

6-OHDA : 6-hydroxydopamine

6-TG : 6-thioguanine

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Les neurones dopaminergiques

1. Les neurones dopaminergiques du système nerveux central

1.1. Généralités

Fonction : synthèse d'un neurotransmetteur, la dopamine

Les neurones dopaminergiques (nDA) sont responsables de la synthèse d'un neurotransmetteur clé appartenant à la famille des catécholamines : la dopamine. La dopamine est impliquée dans un certain nombre de processus et de fonctions physiologiques essentielles tels que le contrôle des mouvements volontaires, le système de récompense, les mécanismes d'apprentissage et de renforcement, le sommeil, la motivation, la mémoire ou encore la cognition.

C'est en 1910 que pour la première fois que George Barger, James Ewens et Henry Dale décrivent la 3-hydroxytyramine ou dopamine (DA). Ils l'appellent ainsi car cette molécule qui appartient à la famille des catécholamines est une monoamine « epinephrine-like » c'est-à-dire proche de l'adrénaline. En 1957, Kathleen Montagu décrit la présence de catécholamines dans le cerveau de plusieurs animaux ainsi que de la 3,4-dihydroxyphénylalanine ou DOPA, le précurseur de la dopamine, chez l'Homme (Montagu, 1957). L'année suivante, en 1958, la présence de DA est décrite dans le cerveau du lapin par Arvid Carlsson et ses collègues (Carlsson et al., 1958). Grâce à une méthode spécifique de fluorescence basée sur le formaldéhyde qui permet de détecter les monoamines dont la dopamine, la noradrénaline l'adrénaline et la sérotonine, ils ont pu observer plus précisément la présence de DA et de noradrénaline dans le système nerveux central (SNC) ainsi que dans les neurones pour la noradrénaline (Carlsson et al., 1962). Ces travaux ont permis d'identifier le rôle de neurotransmetteurs des monoamines (Carlsson et al., 1965). Ils ont également observé qu'il était possible de « faire disparaitre » les monoamines du cerveau en traitant les animaux avec de la réserpine. A travers ces travaux, ils ont pu identifier le rôle de la DA comme neurotransmetteur et son implication dans le mouvement. En traitant des lapins avec de la réserpine, la DA disparaissait complétement du cerveau, les animaux restaient complétement

paralysés et cet effet pouvait être inversé par l'administration du précurseur de la DA : la L-DOPA (forme lévogyre de la DOPA). L'effet de l'administration de L-DOPA pour reformer les stocks de DA dans le cerveau et restaurer les fonctions motrices a ensuite été confirmé plus tard chez des patients atteints de la maladie de Parkinson, une pathologie neurodégénérative dont les symptômes moteurs sont causés par la perte des neurones dopaminergiques (Hornykiewicz, 2002). A la suite de ses travaux sur la DA dans la neurotransmission et son implication dans le mouvement, Carlsson reçu en 2000 le Prix Nobel de Physiologie ou Médecine.

La production des monoamines (sérotonine et catécholamines) dans le cerveau est dépendante de la concentration locale disponible en acides aminés nécessaires à leur formation. Dans les neurones la DA est synthétisée majoritairement à partir de la tyrosine, qui, lorsque sa concentration est élevée, stimule la synthèse des catécholamines (Fernstrom & Fernstrom, 2007). La première étape dans la synthèse de la DA à partir de la tyrosine est catalysée par une enzyme clé et limitante : la tyrosine hydroxylase (TH) qui utilise comme cofacteurs de l'oxygène et la tétrahydrobioptérine (BH_4) (Elsworth & Roth, 1997). Un autre acide aminé, la phénylalanine, est un substrat de cette enzyme et peut également être utilisé indirectement pour la synthèse de DA (Fernstrom & Fernstrom, 2007; Klein et al., 2019). Cette première étape permet de transformer la tyrosine en L-DOPA. Puis, celle-ci est convertie en DA par l'action d'une seconde enzyme, la décarboxylase des acides L-aminés aromatiques (AADC), qui utilise comme cofacteur le phosphate de pyridoxal, également impliquée dans la synthèse de la sérotonine (Christenson et al., 1972; Elsworth & Roth, 1997; Klein et al., 2019) (Figure 1A).

Stockage et transport de la DA

Une fois synthétisée, la DA est principalement stockée dans des vésicules de transport via l'isoforme 2 des transporteurs vésiculaires des monoamines ou VMAT2 (Peter et al., 1995; Schütz et al., 1998; Weihe et al., 1994). La DA est internalisée au sein des vésicules par VMAT2 en échange de 2 protons H^+ (Figure 1B). Le milieu au sein de la vésicule de transport est plus acide pour protéger la DA sensible à l'oxydation dans le cytosol (Guillot & Miller, 2009). Cette acidité est maintenue grâce à l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine diphosphate (ADP) par une V-ATPase qui permet l'internalisation de proton H^+ au sein de la vésicule (Guillot & Miller, 2009). Ensuite, sous l'influx d'un potentiel d'action provoquant une

entrée de calcium dans la cellule, la membrane de la vésicule va aller fusionner avec la membrane pré-synaptique et permettre la libération de la DA dans la synapse (Figure 1C). Il existe deux types de transmission dopaminergique, la transmission phasique ou synaptique qui est contrôlée par les potentiels d'action du neurone lui-même ; et une transmission tonique ou extra synaptique, influencée par l'action d'autres populations de neurones (Floresco et al., 2003; Klein et al., 2019). Le taux de DA au niveau extracellulaire dans la synapse est majoritairement régulé par sa recapture via le transporteur de la DA ou DAT qui utilise le gradient de sodium pour recapturer son ligand (Elsworth & Roth, 1997; Harrington et al., 1996; Klein et al., 2019; Schmidt et al., 2022) (Figure 1C).

Transmission et dégradation

Une fois libérée dans la synpapse, si elle n'est pas recapturée, la DA va être sensible à la dégradation ce qui permet également de réguler le taux de DA extracellulaire. Plusieurs enzymes sont responsables de la dégradation de la DA, au niveau du neurone présynaptique, de la cellule postsynaptique ou dans les cellules gliales proches de la synapse (Meiser et al., 2013). Une d'entre elles est la monoamine oxydase ou MAO. Elle existe sous deux formes en fonction du substrat (MAO-A et MAO-B), la DA étant un substrat pour les deux. Elle est située en intracellulaire au niveau de la membrane externe mitochondriale et convertit la DA en 3,4-dihydroxyphénylacétaldéhyde (DOPAL), puis celui-ci est transformé en acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (DOPAC) par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) (Eisenhofer et al., 2004; Schmidt et al., 2022). Une seconde enzyme, la catéchol-*O*-méthyltransférase (COMT) va soit dégrader la DOPAC en acide homovanillique (HVA), soit convertir la DA directement en 3-méthoxytyramine (3-MT). La 3-MT va ensuite être transformée en HVA par la MAO (Guillot & Miller, 2009). Dans le cerveau, on retrouve deux formes de la COMT, une soluble et une principale membranaire, qui vont dégrader la DA ou la DOPAC au niveau des neurones postsynaptiques ou des cellules gliales (Klein et al., 2019; Myöhänen et al., 2010; Schott et al., 2010). La DA disponible peut alors aller se fixer à des récepteurs à la dopamine spécifiques (Figure 1C).

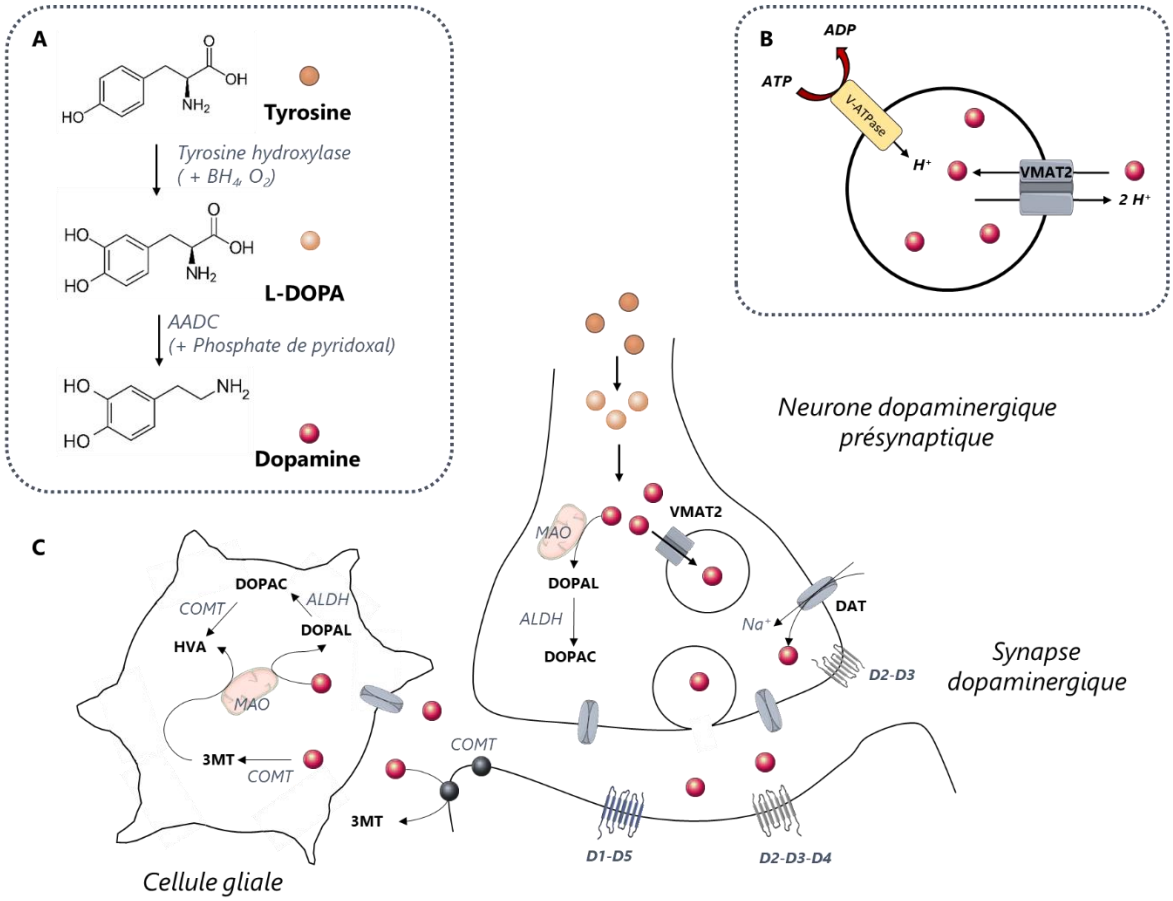


Figure 1 : Schéma de la synthèse et de la transmission dopaminergique.

(A) Synthèse de la DA à partir de la tyrosine. La tyrosine est transformée en L-DOPA par la tyrosine hydroxylase (TH) puis la L-DOPA en DA par la décarboxylase des acides L-aminés aromatique. (B) Transport de la DA dans la vésicule synaptique par VMAT2 et maintien de l'acidité intra-vésiculaire par la V-ATPase. (C) Schéma d'une synapse et de la transmission dopaminergique. AADC : décarboxylase des acides L-aminés aromatique ; ALDH : aldéhyde déshydrogénase ; ADP : adénosine diphosphate ; ATP : adénosine triphosphate ; BH_4 : tétrahydroptérine ; DA : dopamine ; DAT : transporteur de la dopamine ; D1-5 : récepteur à la dopamine 1-5 ; DOPAL : 3,4-dihydroxyphénylacétaldéhyde ; DOPAC : 3,4-dihydroxyphénylacétique ; COMT : catéchol-O-méthyltransférase ; HVA : acide homovanillique ; MAO : monoamine oxydase ; VMAT2 : transporteur vésiculaire des monoamines (isoforme 2) ; 3-MT : 3-méthoxytyramine. (Sources : Schéma (A) : Adapté de Elsworth & Roth, 1997. Schéma (B) : Adapté de Guillot & Miller, 2009. Schéma (C) : Adapté de Meiser et al., 2013. Adaptations réalisées à partir des données Eisenhofer et al., 2004; Guillot & Miller, 2009; Klein et al., 2019; Meiser et al., 2013; Schmidt et al., 2022).

Les récepteurs à la dopamine

On retrouve des récepteurs (Rc) à la dopamine à différents endroits du corps humain : au niveau du cerveau, de la rétine, du cœur, des reins et des surrénales ou encore des vaisseaux sanguins. Il existe cinq types de Rc à la dopamine nommés D_1, D_2, D_3, D_4 et D_5. Ils appartiennent à la grande famille des Rc transmembranaires couplés à une protéine G, appelés également RCPG.

Les récepteurs D_1 et D_2 sont les plus répandus dans le cerveau, D_1 étant le majoritaire. Les trois autres sont moins exprimés et le D_4 est le Rc avec le plus faible niveau d'expression dans le cerveau. Les cinq types de Rc à la dopamine sont séparés en deux grands groupes, les Rc dits « D_1-like » (D_1 et D_5) et les « D_2-like » (D_2, D_3 et D_4) en fonction de leur homologie de séquence, leur activité pharmacologique et leur capacité à agir sur l'activité enzymatique de l'adénylate cyclase (Beaulieu & Gainetdinov, 2011; Jaber et al., 1996; Kebabian & Calne, 1979; Ledonne & Mercuri, 2017). Les Rc « D_1-like » sont couplés à une protéine $G_{s/olf/q}$ et sont responsables de l'activation de l'adénylate cyclase (AC), entrainant une augmentation de la production d'adénosine monophosphate (AMP) cyclique (AMPc) dans la cellule. Les Rc « D_2-like », quant à eux, sont couplés à des protéines G_i ou G_o et vont entrainer l'inhibition de l'AC et la diminution d'AMPc (Beaulieu & Gainetdinov, 2011; Jaber et al., 1996; Klein et al., 2019). En fonction, la voie de signalisation va activer ou inhiber la protéine kinase A (PKA) qui va elle-même ensuite phosphoryler ou non, ses cibles dans le cytoplasme dont une phosphoprotéine de 32 Kda régulée par la dopamine et l'AMPc (DARPP32). Quand DARPP32 est phosphorylée, elle va activer ERK, une autre kinase, directement ou indirectement via l'inhibition de la protéine phosphatase-1 (PPI) (Ledonne & Mercuri, 2017; Svenningsson et al., 2004) (Figure 2).

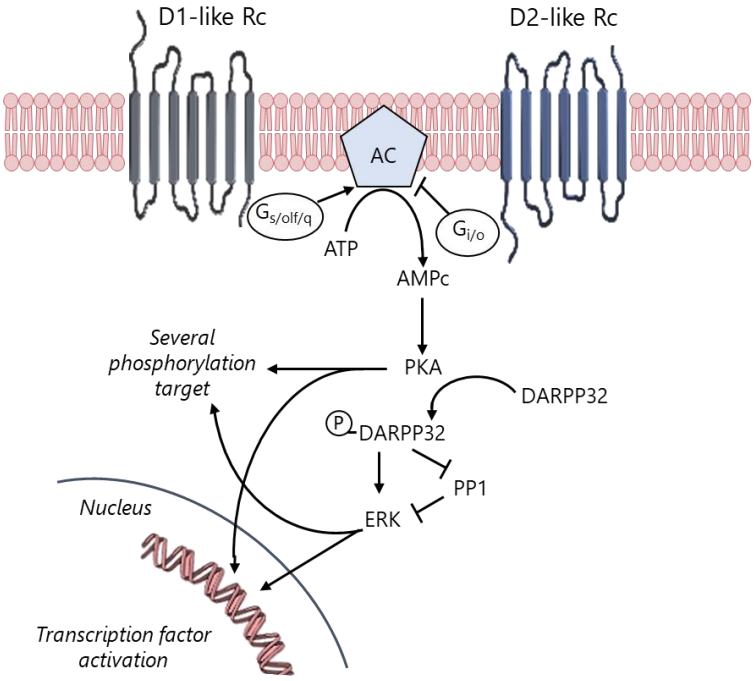


Figure 2 : Schéma simple des deux types de Rc à la DA : les « D_1-like » et les « D_2-like », et de leur voie de signalisation.

AC : adénylate cyclase ; AMPc : adénosine monophosphate cyclique ; ATP : adénosine triphosphate ; DARPP32 : dopamine- and Camp-regulated phosphoprotein, Mr 32 kDa ; ERK : extracellular signal-regulated kinases ; PKA : protéine kinase A ; PP1 : protéine phosphatase-1. (Sources : Adapté de Ledonne & Mercuri, 2017; Mishra et al., 2018).

Au niveau de la synapse des nDA, on peut retrouver en postsynaptique sur les cellules cibles des nDA les cinq types de récepteurs (Figure 1C), alors que seul les Rc D_2 et D_3 peuvent être localisés sur les neurones présynaptiques. Le Rc D_2 joue alors un rôle d'autorécepteur impliqué dans le rétrocontrôle négatif de la libération de DA (Beaulieu & Gainetdinov, 2011). Les Rc à la DA diffèrent également par leur séquence codante et leur structure. En effet, les Rc « D_1-like » ne contiennent pas d'intron dans leur séquence codante contrairement au Rc « D_2-like » qui en contiennent plusieurs permettant la formation de variants (Beaulieu & Gainetdinov, 2011). C'est le cas pour le Rc D_2 qui existe sous deux formes, une forme courte (D_2S) et une forme longue (D_2L). La forme D_2S est majoritairement celle retrouvée en présynaptique (chez les autorécepteurs) tandis que la forme D_2L est celle majoritaire en postsynaptique (Beaulieu & Gainetdinov, 2011; Klein et al., 2019).

Les différentes caractéristiques des types de Rc à la dopamine du cerveau sont résumées

et regroupées dans le Tableau 1 adapté à partir des tableaux et informations présentes dans Beaulieu & Gainetdinov, 2011; Klein et al., 2019; Mishra et al., 2018; Missale et al., 1998.

	D_1 (D_1-like)	**D_5 (D_1-like)**	**D_2 (D_2-like)**	**D_3 (D_2-like)**	**D_4 (D_2-like)**
Locus	5q 35.1	4p16.1	11q23.1	3q13.3	11p15.5
Présence d'introns	Non	Non	Oui	Oui	Oui
Acides aminés	446	477	414(D2S) - 443(D2L)	400	387
Type de protéine G	G_s, G_{olf}	G_s, G_q	G_i, G_o	G_i, G_o	G_i, G_o
Mécanisme d'action	Active l'AC ↗AMPc	Active l'AC ↗AMPc	Inhibe l'AC ↓AMPc	Inhibe l'AC ↓AMPc	Inhibe l'AC ↓AMPc
Expression (SNC)	Majoritairement dans : Striatum, noyau accumbens, substance noire, bulbe olfactif, amygdale, cortex frontal. Plus faiblement dans : Hypothalamus, hippocampe.	Cortex, substance noire, hypothalamus, hippocampe.	Majoritairement dans : Striatum, noyau accumbens, tubercule olfactif. Aussi dans : Cortex, substance noire, VTA, amygdale, hypothalamus, hippocampe.	Surtout dans : Aires limbiques, noyau accumbens, bulbe olfactif, îlots de Calleja. A faible niveau dans : SNpc, striatum, VTA, hippocampe, cortex.	Cortex frontal, amygdale, hippocampe, hypothalamus, globus pallidus et substance noire *pars reticulata* (SNpr).

Tableau 1 : Résumé des caractéristiques des récepteurs à la dopamine.

Résumé des caractéristiques des Rc à la DA : leur localisation chromosomique, la présence ou non d'introns dans leur séquence, le type de protéine G à laquelle ils sont couplés, leur mécanisme d'action et expression dans le système nerveux central.

Ce sont les rôles des Rc D_1 et D_2 qui sont les plus documentés. Ils sont impliqués avec les Rc D_3 dans le contrôle de l'activité motrice, notamment pour leur localisation au niveau des neurones moyens épineux ou MSN pour « medium spiny neurons », des neurones GABAergiques localisés dans le striatum et impliqués dans la régulation des circuits dopaminergiques au niveau des ganglions de la base. Les Rc D_1 et D_2 jouent également un rôle dans l'apprentissage, la mémoire et les comportements de récompense, du fait de leur localisation au niveau du striatum, du bulbe olfactif, des neurones corticaux, de l'hypothalamus,

de l'hippocampe ou encore de l'amygdale (Tableau 1). Les rôles de Rc D_3, D_4 et D_5 ne sont pas encore bien identifiés, cependant leur localisation au niveau d'aires limbiques, de l'hippocampe, de l'hypothalamus, du cortex, de l'amygdale et dans des structures comme le noyau accumbens, les globus pallidus et la SN (Tableau 1), par rapport au deux Rc principaux D_1 et D_2, suggère leur implication dans des fonctions cognitives telle que la mémoire et les émotions (Beaulieu & Gainetdinov, 2011; Klein et al., 2019; Missale et al., 1998).

Le signal dopaminergique peut être modulé par d'autre Rc, c'est le cas des récepteurs à l'adénosine. Les Rc dopaminergiques forment des hétéromères avec deux Rc à l'adénosine, les plus répandus dans le SNC, ADORA1 (A1) et ADORA2A (A2A) notamment au niveau du striatum. A2A, Rc couplé à une protéine G_s, est plutôt localisé au niveau du striatum tandis que A1, couplé à une protéine G_i, est plus largement distribué. Les deux hétérodimères principaux sont A2A(Rc)-D_2(Rc) et A1(Rc)-D_1(Rc). Il existerait également des hétérodimères A2A(Rc)-D_3 et A2A(Rc)-D_4. Les Rc vont ainsi moduler leur action sur l'AC (Ferré et al., 2007; Fuxe et al., 2010) .

1.2. Les voies dopaminergiques

Localisation dans le SNC

Les neurones dopaminergiques (nDA) sont répartis en différents domaines dans le SNC. Chez l'adulte, ils sont localisés majoritairement au niveau d'une structure cérébrale appelée le mésencéphale ventral (MV). Le MV contient environ 75% des neurones dopaminergiques (Björklund & Dunnett, 2007; Hegarty et al., 2013), ce qui représente chez l'Homme entre 400 000 et 600 000 nDA (German et al., 1983; Hegarty et al., 2013; Pakkenberg et al., 1991).

Les sous-groupes dopaminergiques

Les nDA sont répartis en plusieurs clusters en fonction de leur localisation et chaque sous-groupe représente un système distinct d'un point de vue fonctionnel. Ils font partie des neurones catécholaminergiques. Les neurones catécholaminergiques ont été détaillés par Dahlström et Fuxe en 1964 dans un premier temps en douze sous-groupes (ou aires) nommés A1 à A12 répartis de l'hypothalamus jusque dans la medulla oblongata. Par la suite, cinq sous-groupes, A13 à A17, ont été décrits dans le diencéphale, la rétine et le bulbe olfactif (Björklund & Dunnett, 2007; Dahlstroem & Fuxe, 1964). On compte au total dix sous-groupes de nDA dans le cerveau allant de A8 à A17 (Figure 3) (Björklund & Dunnett, 2007; Blaess & Ang, 2015;

Dahlstroem & Fuxe, 1964), les sous-groupes A1 à A7 étant composés d'un autre type de neurones catécholaminergiques : les neurones noradrénergiques. Les aires nDA sont réparties entre différentes structures : le mésencéphale, l'hypothalamus, le bulbe olfactif et la rétine (Blaess & Ang, 2015; Dahlstroem & Fuxe, 1964). Les sous-groupes des nDA correspondent respectivement à l'aire rétrorubrale (RRA ou A8), la substance noire *pars compacta* (SNpc ou A9), l'aire tegmentale ventrale (VTA ou A10), les sous-groupes du diencéphale et de l'hypothalamus (A11 à A15), le sous-groupe du bulbe olfactif (A16) et les cellules de la rétine dites interplexiformes (A17) (Dahlstroem & Fuxe, 1964; Marín et al., 2005).

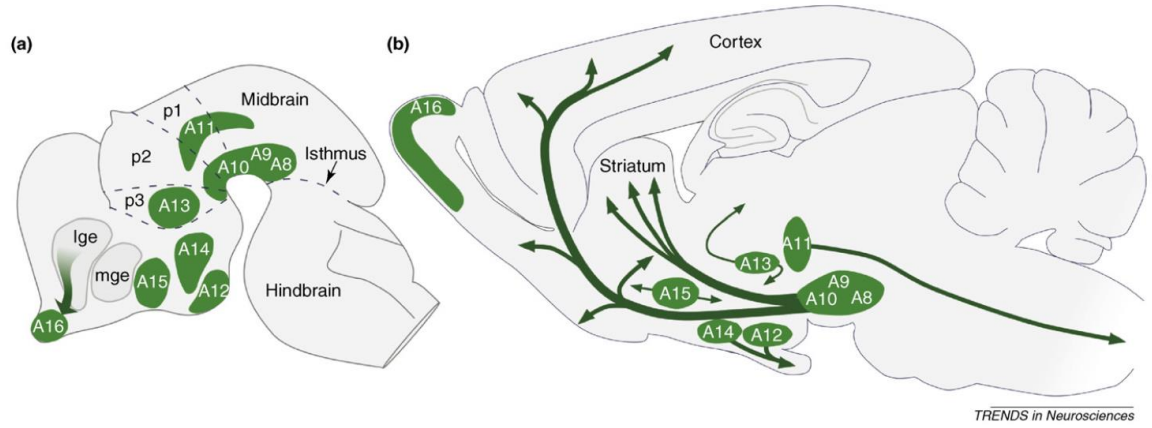


Figure 3 : Distribution des sous-groupes dopaminergiques du SNC chez le rat.

Schéma d'une vue sagittale d'un cerveau de rat en développement (a) et à l'âge adulte (b) représentant la distribution des différents sous-groupes dopaminergiques sauf pour le sous-groupe A17 qui n'est pas représenté sur ce schéma. (Source : Björklund & Dunnett, 2007).

Dans le MV les nDA sont répartis au sein des trois aires A8, A9 et A10. Les projections de ces aires sur d'autres structures cérébrales forment ce que l'on appelle les voies dopaminergiques.

Les voies de projection des neurones DA

On retrouve dans le cerveau quatre voies dopaminergiques dont trois voies principales. Chacune de ces trois voies est impliquée dans des fonctions physiologiques bien spécifiques (Brodski et al., 2019; Klein et al., 2019; Luo & Huang, 2016).

Le première, la voie mésocorticale, est composée des noyaux de la VTA (A10) projetant jusqu'au cortex préfrontal. Cette voie est impliquée dans la modulation des fonctions

cognitives et les émotions. Les neurones de la VTA projettent également le long d'une deuxième voie, cette fois-ci sur le noyau accumbens, appelée voie mésolimbique. Cette seconde voie est impliquée dans les émotions, la motivation et le circuit de la récompense. Enfin, les neurones de la SNpc (A9) sont impliqués dans la voie nigrostriatale, responsable du contrôle des mouvements volontaires. Ils projettent sur une structure appelée le striatum.

Le striatum, rassemblant le noyau caudé et le putamen, appartient à un ensemble de structures qui forment les ganglions de la base aussi appelées *basal ganglia* (Figure 4a). Ces ganglions de la base sont composés du striatum, des segments interne et externe du globus pallidus (Gpi et Gpe) et des structures avec lesquelles ils composent leurs différents circuits (Visser et al., 2000). Ces différents circuits forment des boucles entre des ganglions de la base, le cortex et les noyaux thalamiques (Visser et al., 2000; Yoshida et al., 2022). Il en existe cinq, respectivement impliqués dans la préparation et l'exécution des fonctions motrices, oculaires, cognitives, limbiques et dans la personnalité (Visser et al., 2000). Ils sont modulés par trois neurotransmetteurs : le glutamate, l'acide γ-aminobutyrique (GABA) et la dopamine qui va agir sur le striatum selon deux voies, une voie directe ou activatrice et une voie indirecte ou inhibitrice (Figure 4b). La voie directe projette des MSN du striatum qui expriment le Rc D_1 vers le Gpi et la substance noire *pars reticulata* (SNpr). La voie indirecte, elle, projette des MSN qui expriment les Rc D_2 sur le Gpe (Balint et al., 2018; Bostan & Strick, 2018).

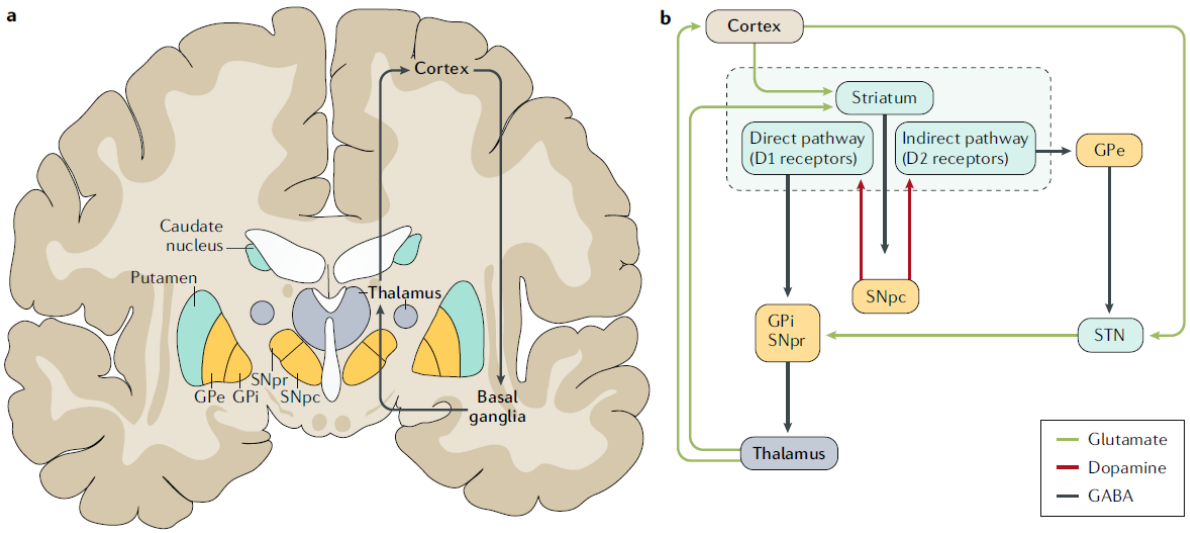


Figure 4 : Schéma simplifié des ganglions de la base.

Ce schéma représente de façon simplifiée le circuit cortico-striato-thalamique (a) et les interactions entre les ganglions de la base, le cortex et le thalamus via les circuits direct et indirect ainsi que les Rc et neurotransmetteurs impliqués (b). GABA : acide γ-aminobutyrique ; Gpe : globus pallidus externe ; Gpi : globus pallidus interne ; SNpc : substance noire pars compacta ; SNpr : substance noire pars reticulata ; STN : noyau subthalamique. (Source : Balint et al., 2018).

Enfin, il existe une quatrième voie dopaminergique, la voie tubéroinfundibulaire, qui projette de l'hypothalamus jusqu'à la glande pituitaire au niveau de l'hypophyse.

Les neurones du sous-groupe A8, qui constituent une extension de la SNpc, projetteraient sur l'ensemble de ces structures : aires limbiques, corticales et striatales. Cependant les fonctions de l'aire rétrorubrale sont encore mal connues (Björklund & Dunnett, 2007; Blaess & Ang, 2015; Klein et al., 2019).

2. Mise en place des neurones dopaminergiques au cours du développement

Les nDA du SNC émergent au cours du développement lors de la mise en place du mésencéphale ventral. Le développement des nDA suit un processus complexe depuis la neurulation jusqu'à la maturation des neurones. Il dépend de l'activation de plusieurs voies de signalisation dépendant de morphogènes et de facteurs de transcription à des temps spécifiques pour permettre le bon positionnement des nDA et leur maintien au cours du développement embryonnaire. Les connaissances actuelles du développement embryonnaire des neurones dopaminergiques proviennent de l'étude de leur mise en place dans différents modèles animaux dont le poulet et la souris. Les temps indiqués par la suite sont exprimés en temps embryonnaire murin. Chez la souris la genèse des nDA a lieu entre les jours embryonnaires E9.5 et E12 suivie de leur maturation jusqu'à E14. Cette période correspond chez l'Homme à la 5^{e} semaine jusqu'à la 11^{e} semaine du développement embryonnaire (Arenas et al., 2015; Nelander et al., 2009). Les mécanismes conduisant au développement des cellules progénitrices des neurones DA du MV font suite au développement et à la régionalisation du tube neural, structure à l'origine du SNC, et débutent à partir du jour embryonnaire E7 chez la

souris.

2.1. Formation du tube neural

Chez les vertébrés, le SNC a pour origine l'épiblaste dorsal du stade gastrula. La première étape de la formation du SNC est la neurulation. La neurulation commence par la formation de la plaque neurale au niveau de l'ectoderme dorsal (Figure 5A1 et B1). L'induction neurale est provoquée par la suppression du destin épidermal via l'inhibition d'une famille de protéines appelées les BMPs (Figure 5A1) pour « bone morphogenetic proteins ». La transduction du signal BMPs passe par l'activation de facteurs de transcription appelés SMAD (une famille de facteur de transcription à effet suppresseur) (Brodski et al., 2019; A. Liu & Niswander, 2005). La sécrétion de Noggin, un antagoniste de la voie BMPs/SMAD, est requise pour la formation du tissu neuro-épithélial (McMahon et al., 1998; Schoenwolf & Smith, 2000). La plaque neurale va s'invaginer pour former la gouttière neurale (Figure 5A2 et B2). Cette dernière va ensuite complétement se refermer (Figure 5A3, B3 et B4). La ligne médiane de la plaque neurale va alors se retrouver au niveau du plancher ventral du tube ou « floor plate » (FP), et les limites de la plaque vont fusionner et se séparer de l'épithélium non-neural (Colas & Schoenwolf, 2001; A. Liu & Niswander, 2005) formant ainsi la partie dorsale du tube neural. C'est la partie dorsale du tube, le « roof plate » (RP) qui sécrète alors à son tour les BMPs (Figure 5A3 et A4). Les BMPs instruisent également la formation d'un ensemble de cellules qui forment la crête neurale, à la limite entre le neurectoderme et l'ectoderme non-neural (A. Liu & Niswander, 2005). Tout au long du tube neural, selon un axe rostro-caudal, plusieurs vésicules vont apparaitre et former les différentes structures cérébrales : le prosencéphale en avant (qui donnera le télencéphale et le diencéphale), puis le mésencéphale, le rhombencéphale et la moelle épinière en arrière (Figure 6) (Barth et al., 1999; Brodski et al., 2019; Colas & Schoenwolf, 2001).

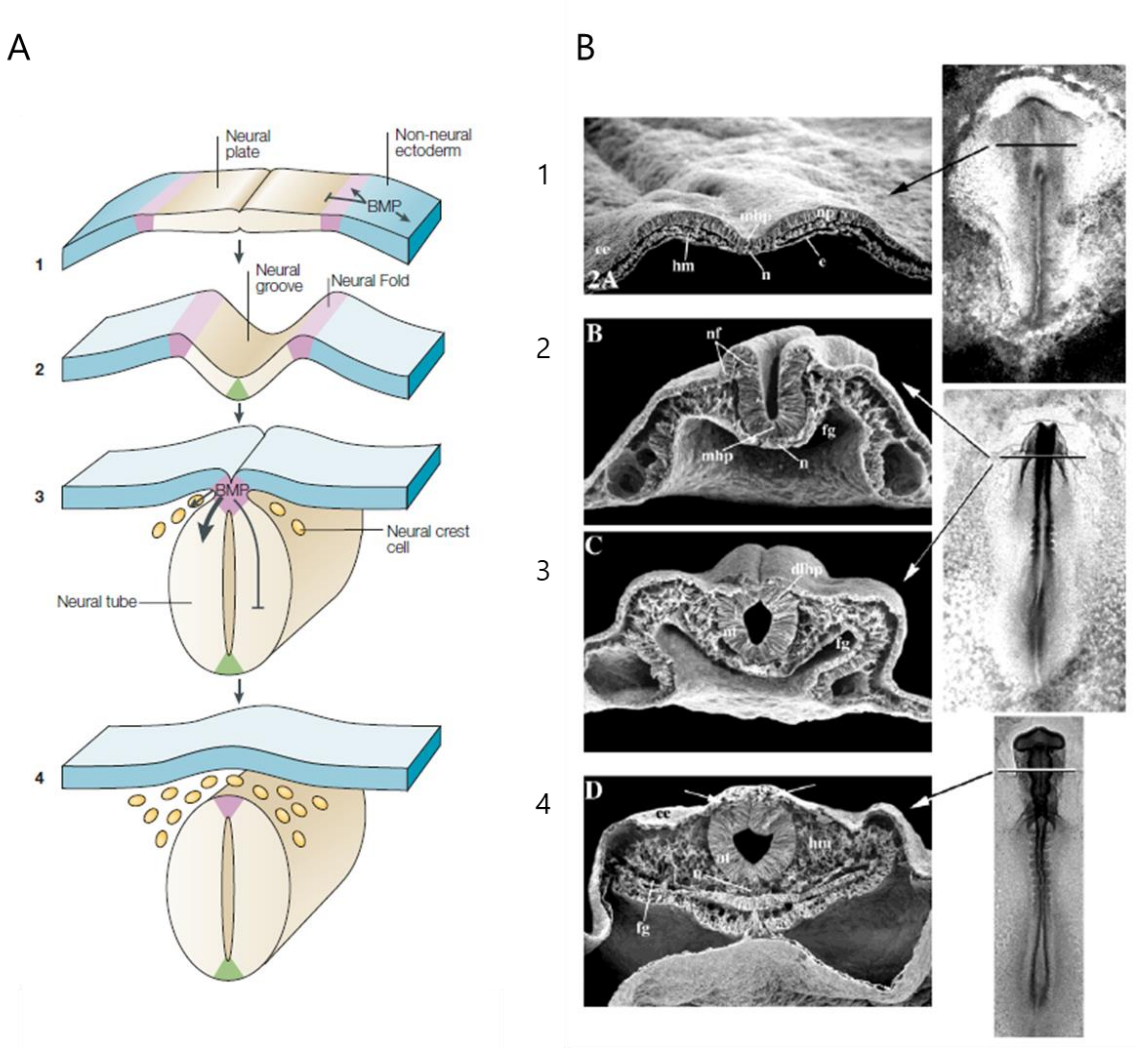


Figure 5 : Schémas et images de microscopie électronique à balayage de la formation du tube neural lors de la neurulation.

(A) Schéma de la formation du tube neural. (1) Limites de la plaque neurale par inhibition du signal BMPs. (2) Invagination de la plaque neurale et formation de la gouttière neurale. Apparition du plancher ventral en vert. (3) Fusion des bords latéraux de la plaque neurale et apparition des cellules de la crête neurale par dérivation du tube neural dorsal. (Source : A. Liu & Niswander, 2005).

(B) Images de microscopie électronique à balayage de la formation du tube neural chez l'embryon de poulet. Les coupes ont été effectuées au niveau du futur mésencéphale. (1) Plaque neurale et début de formation de la gouttière neurale. (2) Gouttière neurale. (3) Tube neural précoce et (4) définitif. (Source : Colas & Schoenwolf, 2001).

2.2. Régionalisation du tube neural et spécification du mésencéphale ventral

Plusieurs régions vont ensuite être spécifiées dans le tube neural selon deux axes : rostro-

caudal ou antéro-postérieur (AP) et dorso-ventral (DV). L'activation de ces voies va permettre la spécification du mésencéphale ventral et par la suite le développement des progéniteurs des nDA qui en émergent. La mise en place du mésencéphale est une étape critique pour le développement des nDA mais également d'autres noyaux de neurones qui vont émerger au cours du développement au niveau de cette structure en plus des neurones de la SNpc et de la VTA : les neurones oculomoteurs (OC) qui innervent les muscles contrôlant les yeux et les neurones dits réticulaires du noyau rouge (NR) (Nelander et al., 2009). L'induction du mésencéphale ventral est permise grâce à deux centres de signalisation importants chez l'embryon, le FP et l'organisateur isthmique (IsO). Cette régionalisation commence tôt dans le développement, vers E7.5 chez la souris.

Etablissement du mésencéphale et de la MBH le long axe AP

Le mésencéphale va être délimité au niveau caudal par une frontière appelée MHB pour « midbrain-hindbrain boundary » le séparant ainsi du cerveau postérieur. L'établissement de cette frontière est déterminant pour le développement des domaines des progéniteurs des neurones dopaminergiques dans le mésencéphale et des neurones sérotoninergiques (ou 5-HT) dans le cerveau postérieur (Brodski et al., 2003; Niederkofler et al., 2015; Puelles et al., 2004). Cette frontière est établie au niveau de l'IsO par l'expression de facteur de transcription, la protéine Orthodenticle Homeobox 2 (OTX2) et la protéine Gastrulation Brain Homeobox 2 (GBX2) (Broccoli et al., 1999; Joyner et al., 2000). OTX2 et GBX2 sont exprimés de façon coordonnée et exercent l'un sur l'autre une répression mutuelle de leur expression (Arenas et al., 2015; Prakash & Wurst, 2004; Wurst & Bally-Cuif, 2001). Ils sont exprimés en avant de la MHB pour OTX2 (Simeone et al., 2011) et en arrière de celle-ci au niveau du cerveau postérieur pour GBX2. De part et d'autre de la MBH, sont ensuite exprimés les morphogènes Wnt1 (les glycoprotéines de la famille des « wingless integration site » ou WNT) et le « secreted Fibroblast growth factor-8 » (Fgf8) (Arenas et al., 2015; Harada et al., 2016; Joyner et al., 2000; Li & Joyner, 2001; Prakash, 2006; Prakash & Wurst, 2004; W. Ye et al., 1998). L'induction de Fgf8 est maintenue par GBX2 et nécessite l'expression de PAX2 (paired box 2) (W. Ye et al., 1998). En plus de l'expression de Wnt1 en avant de la MHB, l'intensité d'expression du Fgf8 va être importante. Une expression plus faible de Fgf8 va favoriser une identité mésencéphalique, tandis qu'une expression plus forte va à l'inverse favoriser une identité postérieure (Harada et al., 2016; W. Ye et al., 1998). Lorsqu'une perte de fonction de la β-caténine cible de la voie de

signalisation Wnt est induite au niveau de la région mésencéphale-rhombomère1 (partie rostrale du cerveau postérieur), elle entraîne une diminution du signal et une augmentation de Fgf8 favorisant ainsi la dérégulation de l'axe AP en faveur du domaine GBX2 avec une diminution de l'expression du LIM homeobex 1a (Lmx1a), de la neurogénine 2 (Ngn2), la protéine homéobox Msh 1 (Msx1) et OTX2 (Arenas et al., 2015; Chilov et al., 2010; Joksimovic & Awatramani, 2014). A l'inverse l'activation excessive de la voie Wnt/ β-caténine augmente la neurogénèse et l'extension du domaine exprimant FOXA2 et Lmx1a (Nouri et al., 2015). L'expression de Otx2 va inhiber celle de la protéine homéobox 2 Nk2 (Nkx2.2), facteur de transcription impliqué dans la spécification des neurones sérotoninergiques émergeant dans le cerveau postérieur et inhibiteur de Wnt1 (Prakash, 2006; Puelles et al., 2004). L'induction ectopique de Wnt1 dans le cerveau postérieur d'embryon de souris conduit à l'expression d'OTX2 et à la génération ectopique de nDA dans le cerveau postérieur (Prakash, 2006). Les facteurs clés et morphogènes exprimés ou sécrétés pour l'établissement du domaine des progéniteurs DA sont représentés de façon simplifiée dans le schéma suivant adapté à partir de celui de (Wexler & Geschwind, 2007) (Figure 6).

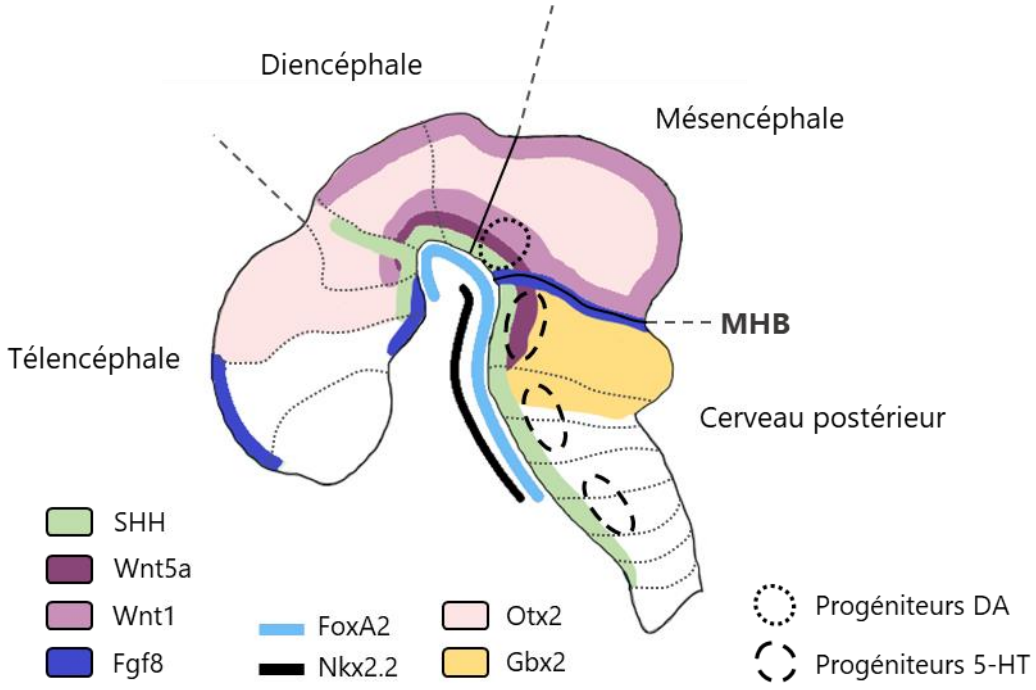


Figure 6 : Schéma simplifié de l'expression des facteurs influençant la mise en place du domaine des progéniteurs dopaminergiques ventraux du mésencéphale.

Schéma du cerveau approximativement au temps E8-E11. Le domaine des progéniteurs des nDA contient les futurs sous-groupes A8, A9 et A10. Ceux des progéniteurs sérotoninergiques 5-HT se situent au niveau de l'expression de FOXA2 et Nkx2.2. (Source : Modifié et adapté à partir de Wexler & Geschwind, 2007).

Positionnement du MV selon l'axe DV

La régionalisation ventrale est déjà en partie réalisée grâce à l'action de la voie des BMPs/SMAD qui ont été sécrétées par le RP du tube neural permettant ainsi sa dorsalisation. En plus des BMPs, l'activation de la voie canonique WNT/β-caténine par WNT1 et la sécrétion du morphogène Sonic Hedgehog (SHH) par le FP sont déterminantes pour l'acquisition du potentiel neurogénique du FP du mésencéphale qui est très élevé (Brodski et al., 2019; Joksimovic & Awatramani, 2014) ainsi que pour l'orientation de l'axe DV. Sous le tube neural, une structure appelée notochorde, sécrète SHH qui va stimuler sa propre expression par le FP à partir de E8.5 (Figure 7). Vers le jour embryonnaire E8, l'expression du facteur de transcription Forkhead box A2 (FOXA2) par le FP et la plaque basale (structure plus latérale que le FP) va déterminer le destin ventral du mésencéphale. FOXA2 va contrôler l'expression de SHH via une boucle de régulation avec le facteur de transcription « glioma-associated Oncogene » ou GLI1/2 (Arenas et al., 2015). Les deux gradients Wnt et SHH jouent un rôle antagoniste. Des expériences chez la souris ont montré que lorsque la β-caténine de la Wnt était stabilisé, l'axe DV se retrouvait dérégulé en faveur de l'expression de SHH (Chilov et al., 2010; Joksimovic et al., 2009). A l'inverse, la diminution du signal SHH conduit à une diminution des progéniteurs ventraux (Tang et al., 2013). Plus latéralement, au niveau du plancher basal où l'expression de SHH est moins importante que dans le FP, le gradient SHH et l'expression de FOXA2 sont également déterminants pour le positionnement des noyaux OC et NR (Arenas et al., 2015; Tang et al., 2013). FOXA2 est exprimé par les progéniteurs des neurones OC et NR avec la protéine homeobox Nkx6.1 (Arenas et al., 2015; Blaess et al., 2011; Ferri et al., 2007; Prakash et al., 2009; Puelles et al., 2004).

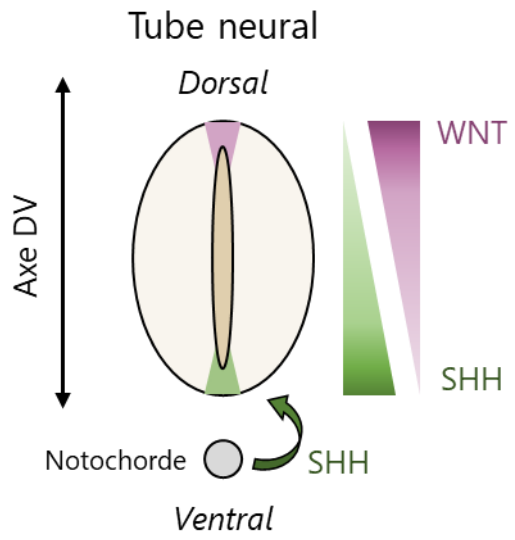


Figure 7 : Schéma des gradients WNT et SHH suivant l'axe DV du tube neural.

En violet, le gradient Wnt va agir avec BMP pour l'orientation dorsale de l'axe. En vert, le gradient antagoniste SHH va permettre la ventralisation (Source : Adapté de M. Wang et al., 2020).

2.3. Spécification des progéniteurs dopaminergiques du MV

La spécification des progéniteurs dopaminergiques du MV commence aux alentours du temps E8.5 chez la souris. OTX2 et FOXA2 régulent l'expression des facteurs de transcription Lmx1a et Lmx1b nécessaires à la spécification des progéniteurs des nDA (Arenas et al., 2015; Smidt et al., 2000). Ces deux facteurs se régulent entre eux, et Lmx1b est nécessaire pour la régulation des facteurs Wnt1 et Msx1 impliqués dans la spécification du MV (Arenas et al., 2015) et pour l'expression de deux gènes clés dans le potentiel de différenciation et la survie des nDA : NURR1 (Nuclear receptor-related factor 1) et PITX3 (Paired like homeodomain 3) (Smidt et al., 2000; Smits & Smidt, 2006; Wever et al., 2019). De plus, Lmx1a/b semblent indispensables pour le maintien de l'IsO et la différenciation des nDA, des expériences modélisant leur absence dans des modèles souris ayant entrainer la perte des nDA (Smidt et al., 2000; Wever et al., 2019; Yan et al., 2011). Lmx1a est également nécessaire à la détermination de l'identité dopaminergique des progéniteurs et à l'activation de Msx1 et de la protéine proneurale Ngn2 (E. Andersson, Jensen, et al., 2006; E. Andersson, Tryggvason, et al., 2006; Arenas et al., 2015; Prakash & Wurst, 2006). Ngn2 avec un autre facteur de transcription, Achaete-scute homolog 1 (Ascl1), sont impliqués dans la régionalisation et, plus tard, dans la neurogenèse (E. Andersson, Jensen, et al., 2006; E. Andersson, Tryggvason, et al., 2006; Mesman

& Smidt, 2020; L. H. Thompson et al., 2006). Enfin, Wnt1 est essentiel pour l'expression de Lmx1a et Ngn2. En effet, la perte de Wnt1 et Wnt5a chez des souris, a entrainé la perte de ces deux facteurs de transcription ainsi que celle de NURR1 et PITX3 (E. R. Andersson et al., 2013; Smidt et al., 2000).

Un autre groupe de facteurs va rentrer en jeu plus tardivement pour définir l'identité dopaminergique du MV, les facteurs de transcription et homéodomaines Engrailed 1 et 2 (EN-1/2). Ils sont exprimés au niveau de la MHB (mésencéphale et cerveau postérieur rostral) par les progéniteurs dopaminergiques à partir de E9 et ce jusque dans l'âge adulte dans les neurones matures (Alves dos Santos & Smidt, 2011; Blaess & Ang, 2015; Hegarty et al., 2013; Kouwenhoven et al., 2017; A. Liu & Joyner, 2001; Simon et al., 2001). La perte de l'expression de EN-1 et EN-2 chez des mutants double KO entraine une perte importante des nDA vers E14 malgré le développement normal de ceux-ci (A. Liu & Joyner, 2001; Simon et al., 2001). Ces données suggèrent un rôle clé dans le maintien des progéniteurs et des précurseurs post-mitotiques et la survie des nDA (Alves dos Santos & Smidt, 2011; Blaess & Ang, 2015; Hegarty et al., 2013; A. Liu & JoyneR, 2001; Simon et al., 2001).

2.4. Différenciation et maintien des neurones DA

Différenciation en nDA

La différenciation, vers E10.5, des progéniteurs DA du MV est contrôlée par deux protéines proneurales : Ascl1 et Ngn2. Plusieurs facteurs de transcription vont être impliqués : EN-1/2, Nurr1, Pitx3, Lmx1b, et lmx1a qui permet l'induction de la Ngn2 via Msx1 (E. Andersson, Tryggvason, et al., 2006; Ferri et al., 2007; Hegarty et al., 2013; Kele et al., 2006). Pendant leur maturation au niveau du FP, les nDA vont subir une migration de la zone ventriculaire qui est toujours proliférative vers la zone intermédiaire, où les cellules vont sortir du cycle cellulaire et devenir post-mitotiques, puis jusqu'à la zone la plus ventrale une fois différenciées (Figure 8) (Arenas et al., 2015; Gale & Li, 2008). Pitx3 et Nurr1 sont régulés par Wnt1 et FOXA2 respectivement (Ferri et al., 2007; Hegarty et al., 2013). Ils vont permettre l'expression de la TH et du facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) via l'induction du facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales (GDNF) (Peng et al., 2011), ainsi que la régulation des gènes et des facteurs qui définissent les nDA matures: VMAT2, DAT, AADC et le gène de l'aldéhyde déshydrogénase (famille 1, sous-famille A1) ALDH1A1 (Hwang et al., 2009; Jacobs

et al., 2009, 2011; Jankovic et al., 2005; Peng et al., 2011; Volpicelli et al., 2007, 2020).

La voie de signalisation Wnt/β-caténine est à nouveau impliquée dans l'expression des facteurs de transcription impliqués dans la neurogenèse par son activation via Wnt1 et Wnt5a (E. R. Andersson et al., 2008; Joksimovic et al., 2012). Wnt5a est exprimé à partir de E9.5 et son inactivation dans des modèles murins KO ont conduit à une entrée en différenciation retardée des progéniteurs Nurr1+ avec une altération de la morphogénèse du mésencéphale et de la différenciation des nDA (E. R. Andersson et al., 2008, 2013). La perte de l'expression de Wnt1 chez des souris KO $Wnt1^{-/-}$ a quant à elle entrainé une diminution importante des progéniteurs dopaminergiques et des nDA du MV (Prakash, 2006; Wurst & Prakash, 2014; J. Yang et al., 2013). La diminution du nombre de cellules exprimant Nurr1 et la TH au niveau du MV est d'autant plus marquée dans les modèles doubles mutants pour la perte de Wnt1 et Wnt5a (E. R. Andersson et al., 2013).

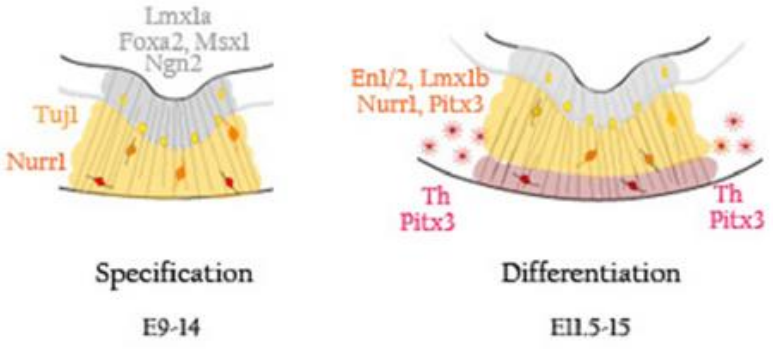


Figure 8 : Représentation schématique de la spécification et la maturation des nDA dans le MV à partir de E9 jusqu'à E15.

Lmx1a, Msx1 et FoxA2 favorisent la neurogénèse des nDA via la Ngn2. Les progéniteurs dopaminergiques de la zone ventriculaire (en gris) migrent vers la zone intermédiaire (en jaune) en spécifiant leur destin neuronal via l'expression de Nurr1. Les progéniteurs sont maintenus grâce à l'expression d'EN-1/2. Ensuite Pitx3, régulé par Lmx1b et Wnt1, associé à Nurr1 sont nécessaire à la maturation et l'expression de la TH. A partir de E11.5, les cellules Pitx3+ et TH+ continuent leur migration vers la zone plus ventrale du MV (en rouge). Tuj1 est un marqueur neuronal. (Source : Gale & Li, 2008).

Maintien des nDA matures

Le maintien et la survie des nDA matures du MV sont assurés par les facteurs de transcription Pitx3, Nurr1 et BDNF (Hegarty et al., 2013; Jacobs et al., 2009; Kouwenhoven et al., 2017; Smits & Smidt, 2006). Dans leur travaux Peng et al., 2011 ont montré que lorsqu'il y a une perte de l'expression de BDNF, on pouvait observer une augmentation de l'expression de la caspase 3 (marqueur de l'apoptose cellulaire) dans les neurones du MV rostral des souris Pitx3$^{-/-}$. De plus, lorsque des cultures primaires de cellules du MV des souris double mutantes Pitx3$^{-/-}$ sont traitées au BDNF, cela aurait permis de diminuer le niveau d'expression de la caspase à celui du contrôle suggérant un effet protecteur du BDNF contre l'apoptose (Peng et al., 2011). Dans les travaux de Kouwenhoven et al., 2017 ; la perte de l'expression des facteurs EN-1 et de Pitx3 seuls ou combinés chez les animaux mutés a conduit à une diminution sévère du nombre de nDA matures à la fin de la phase de différenciation (Kouwenhoven et al., 2017).

Hegarty et al. ont synthétisé les travaux étudiant les mutations affectant les gènes du développement des nDA du MV et leurs conséquences sur l'établissement de leur domaine et leur survie (Tableau 2) (Hegarty et al., 2013).

Mutation(s)	Effect(s) on DA development	Reference(s)
Otx2 –/–	Loss of VM DA neurons (midbrain absent)	Acampora et al. (1995), Ang et al. (1996)
Wnt1 –/–	Severe reduction in VM DA neurons generated	McMahon and Bradley (1990), Prakash et al. (2006)
Pax2 –/–:	Loss of VM DA neurons (midbrain absent)	Schwarz et al. (1997)
Pax5 –/–		
En1 –/–:	VM DA neurons lost by E14 via apoptosis	Alberi et al. (2004), Liu and Joyner (2001), Simon et al. (2001)
En2 –/–		
Lmx1b –/–	Substantial reduction in VM DA neurons generated, and disappearance of Pitx3^{-} VM DA neurons by birth	Deng et al. (2011), Smidt et al. (2000)
Hes1 –/–	Transient increase (~E12) in VM DA neurons, followed by their significant reduction (from E13.5). Dorsal migration and hindbrain invasion	Kameda et al. (2011)
Nato3 –/–	Reduction in VM DA neurons generated	Ono et al. (2010)
FGFR –/–	Deficit of VM DA neurons	Lahti et al. (2012), Saarimaki-Vire et al. (2007)
FGF2 –/–	Peri-/post-natal increase in VM DA neurons	Ratzka et al. (2012)
Lmx1a –/–	Substantial reduction in VM DA neurons generated	Deng et al. (2011), Ono et al. (2007)
En1$^{Cre/+}$; Otx2$^{flox/flox}$	Reduction in VM DA neurons due to failure of VM DA NP induction	Omodei et al. (2008), Puelles et al. (2004)
Ngn2 –/–	Reduction in mature VM DA neurons generated	Kele et al. (2006)
Oc1 –/–:	Reduction in VM DA neurons generated	Chakrabarty et al. (2012)
Oc2 –/–		
Gli1 –/–:	Deficient VM DA neurogenesis (more severe than Gli2 –/–)	Park et al. (2000)
Gli2 –/–		
Gli2 –/–	Deficient VM DA neurogenesis	Park et al. (2000)
Lmx1a –/–; Shh$^{Cre/+}$; Lmx1b –/–	Substantial reduction in VM DA neurons generated (more severe than Lmx1a –/–)	Yan et al. (2011)
Lmx1a –/–: Lmx1b +/–	Substantial reduction in the generation of VM DA neurons (more severe than Lmx1a –/–)	Deng et al. (2011)
Lrp6 –/–	Delayed differentiation of VM DA neurons	Castelo-Branco et al. (2010), Pinson et al. (2000)
Fzd3 –/–:	Deficient VM DA neurogenesis (severe midbrain defects)	Stuebner et al. (2010)
Fzd6 –/–		
Fzd3 –/–	Transient reduction in VM DA neuron generated	Stuebner et al. (2010)
Wnt2 –/–	Reduction in VM DA neurons generated	Sousa et al. (2010)
β-catenin (Th-IRES-Cre; β-Ctn$^{Ex3/+}$ mutant)	Reduction in VM DA neurogenesis	Tang et al. (2009)
Dkk1 –/–	Severe loss of VM DA neurons	Ribeiro et al. (2011)
L1 –/–	Positional abnormalities of VM DA neurons	Demyanenko et al. (2001)
Reelin –/–	Failure of VM DA neuron lateral migration	Nishikawa et al. (2003)
DCC –/–	Aberrant VM DA neuron migration, dorsal shifting of ventral striatal DA projections, aberrant crossing of MFB fibres at caudal diencephalic midline, and reduction of prefrontal cortex DA innervation	Xu et al. (2010)
Ebf1 –/–	Impaired tangential migration of VM DA neurons	Yin et al. (2009)
Nurr1 –/–	Lack TH, AADC, VMAT2 and DAT expression in VM DA neurons, and their subsequently loss	Castillo et al. (1998), Filippi et al. (2007), Saucedo-Cardenas et al. (1998), Smits et al. (2003), Wallen et al. (1999)
Nurr1 –/– (at late stage of DA dev.)	VM DA neuron degeneration (snc more vulnerable)	Kadkhodaei et al. (2009)
FoxA2 –/–	Increase in numbers of Nurr1^{+} TH^{-} neurons in VM	Ferri et al. (2007)
FoxA2 +/–	Aged mice develop PD-like symptoms and pathologies	Kittappa et al. (2007)
Pitx3 –/–	Deficit of snc DA neurons from E12.5 (VTA largely unaffected)	Hwang et al. (2003), Nunes et al. (2003), Smidt et al. (2004), Van Den Munckhof et al. (2003)
En1 +/–:	Progressive degeneration of VM DA neurons (8–24 weeks)	Sonnier et al. (2007)
En2 +/+		
En1 +/–:	Progressive degeneration of VM DA neurons (more pronounced in snc)	Sgado et al. (2006), Sonnier et al. (2007)
En2 –/–		
Nkx2.1 –/–	Aberrant crossing of MFB fibres at caudal diencephalic midline	Kawano et al. (2003)
DCC +/–	Increased branching of VM DA fibres in prefrontal cortex	Manitt et al. (2011)
Pbx1a –/–	Partial misrouting of VM DA fibres	Sgado et al. (2012)
Pax6 –/–	Dorsal deflection of MFB fibres in the diencephalon	Vitalis et al. (2000)
Slit1 –/–:	Aberrant crossing of MFB fibres at caudal diencephalic midline	Bagri et al. (2002), Dugan et al. (2011)
Slit2 –/–		
Robo1 –/–:	Aberrant crossing of MFB fibres at caudal diencephalic midline, and abnormal dorsal trajectories of VM DA fibres	Dugan et al. (2011), Lopez-Bendito et al. (2007)
Robo2 –/–		

Tableau 2 : Mutations génétiques affectant les différents facteurs et leurs conséquences sur le développement des nDA du MV.

Le tableau ci-dessus reprend les mutations des facteurs de transcription et morphogènes essentiels ou impliqués dans le développement des nDA du MV et de leurs progéniteurs (première colonne), leurs conséquences (colonne du milieu) et les références des travaux (dernière colonne).

(Source : Hegarty et al., 2013).

Sous spécification des différents groupes de nDA

Les nDA matures peuvent être identifiables dans leur ensemble par l'expression des marqueurs des neurones dopaminergiques différenciés suivants : les transporteurs VMAT2 et DAT, les enzymes clés de la synthèse de la DA, en particulier la TH, et l'AADC. Toutefois, il n'est pas possible en se basant sur ces seuls marqueurs de distinguer les neurones des sous-populations dopaminergiques de la SNpc et de la VTA. Il existe pour cela des différences morphologiques et dans l'expression de certains facteurs ou protéines entres les deux groupes. Dans le cerveau il est possible de distinguer les neurones dopaminergiques en sous-groupes (A8 à A17) selon leur localisation, leurs fonctions et leurs projections. Dans le mésencéphale ventral, les populations principales A9 pour la SNpc et A10 pour la VTA peuvent également être distinguées en fonction des différences morphologiques entre les deux types de neurones (Figure 9). Les nDA de la SNpc semblent plus gros et plus anguleux tandis que les neurones de la VTA, sont eux plus petits et de forme plus arrondie.

En plus des différences morphologiques, une diversité moléculaire nDA émerge au cours du développement et il est possible de différencier ces sous-groupes en fonction des facteurs de transcription déterminant le destin des groupes et par les protéines exprimées (Poulin et al., 2020; L. Thompson et al., 2005; Tiklová et al., 2019). La distinction entre les neurones de la SNpc et la VTA se fait le plus souvent sur l'expression de la protéine de liaison au calcium, la calbindine (CLB), et du canal de rectification potassique 2 régulé par une protéine G, GIRK2 (Figure 9). GIRK2 est exprimé par une majorité des neurones de la SNpc au niveau ventral et dans la partie dorsolatérale de la VTA tandis que la CLB est quant à elle exprimée par une partie des nDA de la SNpc au niveau dorsal et par les neurones de la VTA majoritairement. De plus les neurones de la SNpc sont pigmentés par la neuromélanine (Bodea & Blaess, 2015; McRitchie et al., 1996; Mendez et al., 2005; Poulin et al., 2020; Reyes et al., 2012; L. Thompson et al., 2005).

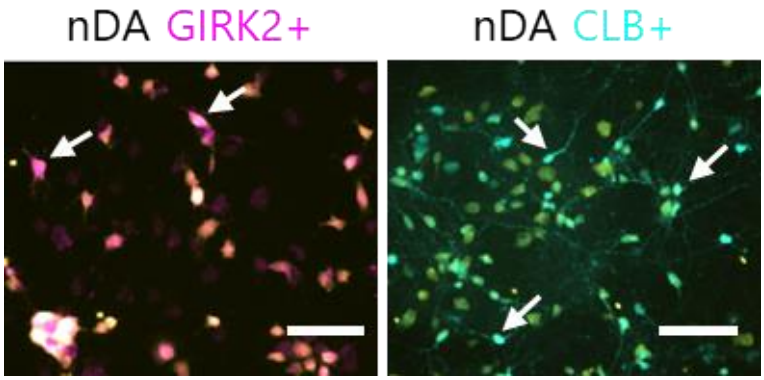


Figure 9 : Exemple de différences morphologiques et moléculaires chez les nDA.

Les neurones de la SNpc expriment GIRK2 (magenta) et ont des corps cellulaires volumineux et anguleux (flèches blanches sur la gauche) tandis que les neurones de la VTA expriment plutôt CLB (cyan) et sont plus petits et arrondis (flèches blanches sur la droite). Barre d'échelle : 50 µm.

(Source : Données personnelles).

Parmi les facteurs déterminant l'identité des nDA, on retrouve également OTX2, le facteur de transcription SOX6 (SRY-Box Transcription 6) et la protéine en doigt de zinc 503 : ZFP503, aussi appelée NOLZ1. Des modèles de gain et de perte de fonction de Otx2 ont montré que l'expression du facteur de transcription était requise pour l'identité VTA des nDA et permettrait d'inhiber celle de Girk2 et du DAT. Son expression ectopique dans la SNpc permettrait de protéger et de maintenir les cellules face à l'action de la neurotoxine 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) utilisée pour détruire spécifiquement les nDA de la SNpc dans les modèles de la maladie de Parkinson en bloquant la recapture par le transporteur DAT et permettrait également de compenser la perte progressive des neurones de la SNpc chez des souris haploinsuffisantes, pour EN-1 (Di Giovannantonio et al., 2013; Di Salvio et al., 2010; Simeone et al., 2011). OTX2 contrôle aussi l'expression de SOX6. SOX6 est exprimé par les cellules de la SNpc mais aussi dans la VTA au niveau dorsolatéral (Bodea & Blaess, 2015; Panman et al., 2014; Pereira Luppi et al., 2021; Poulin et al., 2014, 2020). NOLZ1, lui, est exprimé dans une sous-partie des neurones de la VTA et son absence entrainerait une perte de l'identité SNpc (Bodea & Blaess, 2015; Panman et al., 2014; Soleilhavoup et al., 2020). La perte de SOX6 entraîne quant à elle une diminution de l'expression des marqueurs de la SNpc et affecte la capacité de ces neurones à aller innerver le striatum via leurs projections sur celui-ci (Panman et al., 2014; Pereira Luppi et al., 2021). On observe également une augmentation des marqueurs

de la VTA, alors que la perte de OTX2 provoque une augmentation de SOX6. A l'inverse l'expression forcée de OTX2 provoque une diminution de l'expression de SOX6 (Bodea & Blaess, 2015; Panman et al., 2014).

Pour simplifier, au niveau ventral du mésencéphale les deux sous-groupes des nDA peuvent être distingués selon les caractéristiques suivantes :

- Les nDA de la SNpc ventrale expriment les marqueurs GIRK2, DAT, ALDH1A1 et SOX6.
- Les nDA de la VTA expriment au niveau ventral la CLB, ALDH1A1, NOLZ1 et OTX2.

Grâce à des approches plus récentes telles que la microfluidique ou le RNA-sequencing en single-cell, il est possible d'aller étudier le développement et la diversité des nDA dans le cerveau humain ou chez la souris (La Manno et al., 2016; Poulin et al., 2014, 2020).

Pour conclure, la mise en place des nDA du MV au cours du développement embryonnaire, est un ensemble de processus complexes soumis à une régulation spatiale et temporelle très précise (Figure 10). La moindre altération ou dérégulation de ces processus peut entraîner des conséquences variées sur le développement de ces neurones.

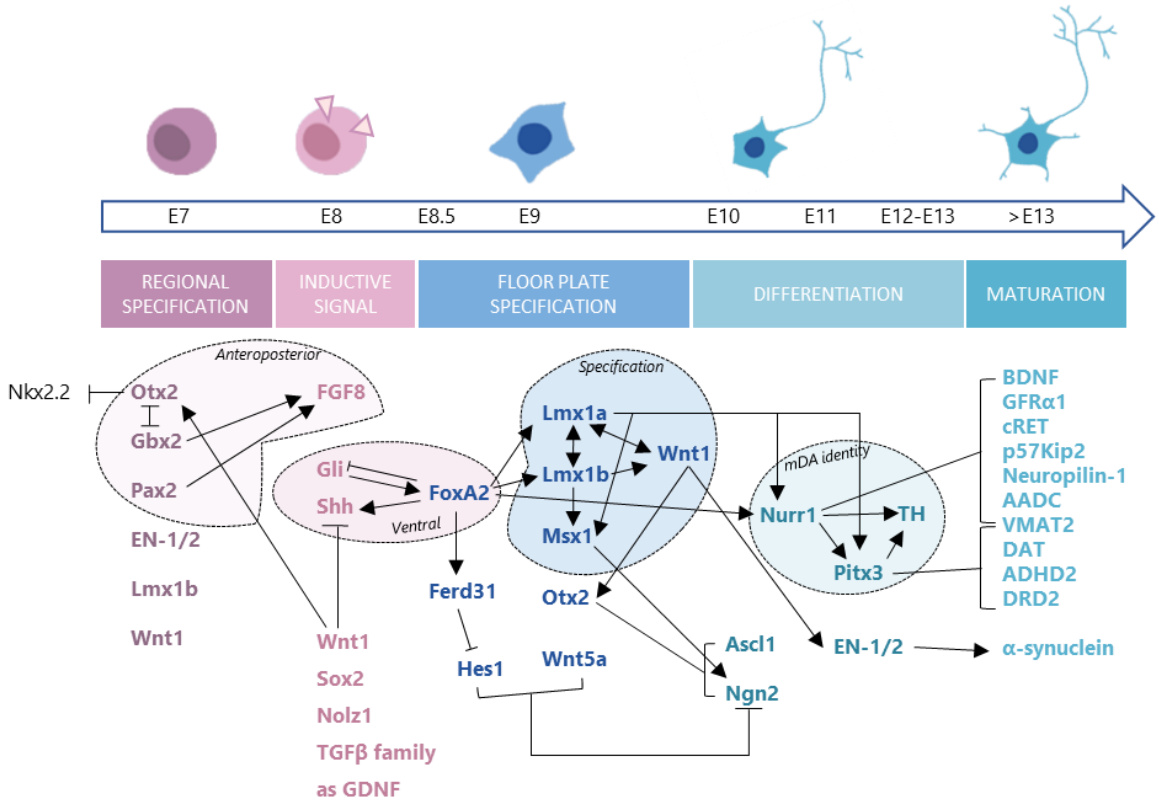


Figure 10 : Schéma simplifié des interactions génétiques impliquées dans le développement des nDA du MV chez la souris.

Ce schéma représente les interactions simplifiées connues entre les différents acteurs, facteurs de transcription induits, protéines sécrétées et morphogènes impliqués dans la mise en place du domaine des nDA dans le MV et leur différenciation. Dans le cerveau de la souris ce processus commence au temps E7 et jusqu'au neurones matures à E14.5 et au-delà. (Source : Reproduit et adapté de Volpicelli et al., 2020).

3. Les pathologies impliquant les nDA et leur signalisation

Les nDA étant impliqués dans un certain nombre de processus physiologiques clés, lorsqu'il survient des altérations au niveau des neurones ou des voies dopaminergiques, cela peut entrainer des pathologies pouvant être sévères. En fonction du type de nDA impliqué, les altérations du système dopaminergique peuvent conduire à des troubles moteurs, des pathologies neurodégénératives ou des troubles neuropsychiatriques. Les nDA sont également impliqués dans des phénomènes d'addiction (Figure 11). Les perturbations des voies dopaminergiques peuvent survenir au cours du développement et jusqu'à l'âge adulte, être la

conséquence de divers facteurs (génétiques ou par exemple pharmacologiques) et concerner plusieurs éléments ou étapes de la transmission dopaminergique comme par exemple la synthèse, le transport ou la transmission (Areal & Blakely, 2020; Shen et al., 2012).

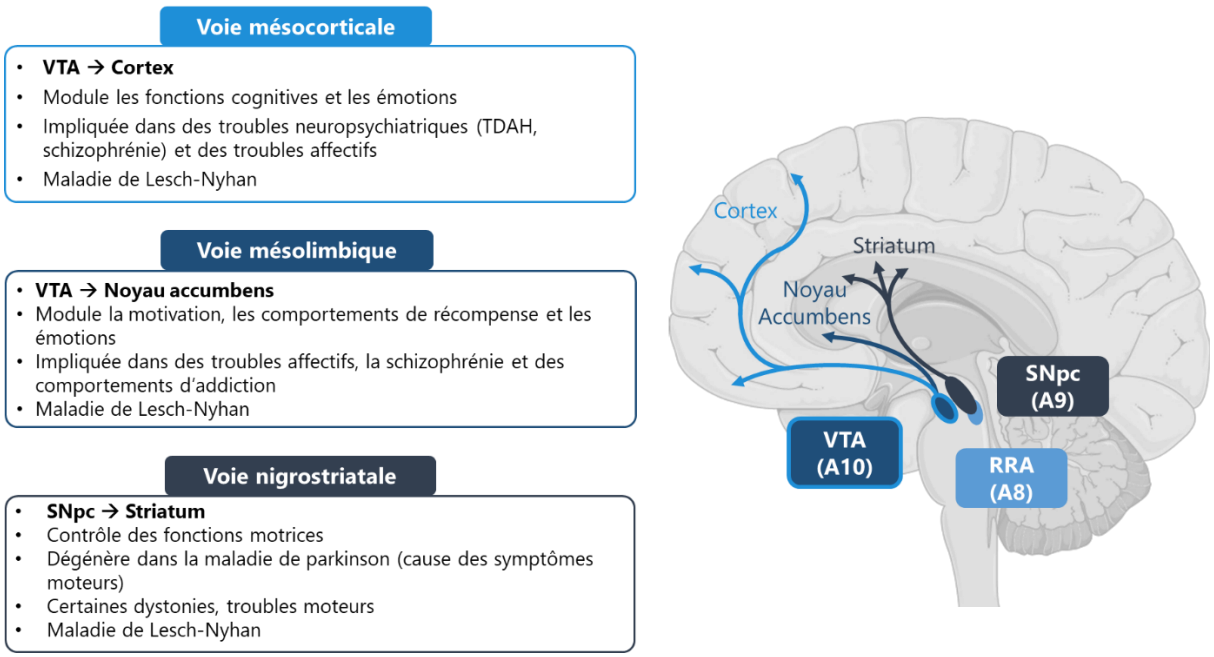


Figure 11 : Schéma simplifié des trois principales voies dopaminergiques, leurs cibles, leurs rôles physiologiques et leurs implications pathologiques.

RRA : aire rétrorubrale, SNpc : substance noire pars compacta, TDAH : trouble du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité, VTA : aire tegmentale ventrale. (Source : Adapté de Brodski et al., 2019).

3.1. Les pathologies neurodégénératives

La maladie de Parkinson

La pathologie la plus connue impliquant les nDA est la maladie de Parkinson. Cette pathologie est la deuxième maladie neurodégénérative la plus fréquente au monde après la maladie d'Alzheimer. Historiquement, cette pathologie est caractérisée par l'apparition de mouvements anormaux et le ralentissement des mouvements volontaires traduit par la bradykinésie, des tremblements au repos et une rigidité. Ils sont provoqués par la dégénérescence et la perte des nDA de SNpc associée à l'apparition de corps de Lewy

(Magrinelli et al., 2016) liés à l'accumulation d'inclusions d'une protéine, l'α-synucléine, lorsque celle-ci est mal conformée. D'autres symptômes lui sont associés tels que des troubles de la posture, de la déglutition, des troubles digestifs et sexuels, des perturbations des fonctions exécutrices, de la mémoire, l'apparition d'une démence ou encore d'une dépression. Cet ensemble de symptômes moteurs et non moteurs en font une pathologie pluri-symptomatique impliquant les ganglions de la base, ainsi que d'autres voies et neurotransmetteurs non dopaminergiques (Chaudhuri & Schapira, 2009; Magrinelli et al., 2016). Les autres neurotransmetteurs impliqués dans la maladie sont l'adénosine, l'acétylcholine, le GABA, le glutamate, l'histamine, la noradrénaline et la sérotonine (Chaudhuri & Schapira, 2009; Magrinelli et al., 2016). Ces voies sont d'ailleurs la cible de certaines des thérapies médicamenteuses administrées pour soulager les symptômes. Le traitement principal de la maladie de Parkinson est l'administration de Lévodopa (L-DOPA) associée à un inhibiteur de la dopadécarboxylase pour permettre à la molécule de traverser la barrière hémato-encéphalique et être métabolisée en DA dans le cerveau. A long terme ce traitement peut entrainer des dyskinésies et d'autre molécules ont depuis été ajoutées pour la prise en charge symptomatique des patients telles que des inhibiteurs de la MAO-B, des agonistes dopaminergiques D_{1-3}, des inhibiteurs des COMT ou encore des molécules anticholinergiques (Balestrino & Schapira, 2020). On retrouve également des composés ciblant la transmission sérotoninergique : des agonistes des Rc 5-HT1A 5-HT1B (Balestrino & Schapira, 2020) à l'essai ou un modulateur de Rc 5-HT2A récemment approuvé aux Etats-Unis (Lyons et al., 2019; Tariot et al., 2022). Des études sont aussi conduites sur le potentiel d'amélioration de la dyskinésie par des antagonistes des Rc A2A. L'adénosine agirait sur les Rc A2A localisés au niveau des MSN et bloquerait les Rc D_2 de la voie indirecte (Balestrino & Schapira, 2020; Magrinelli et al., 2016). Enfin, la stimulation cérébrale profonde est également une alternative thérapeutique qui consiste à implanter chirurgicalement des électrodes dans le cerveau des patients permettant de réduire les symptômes moteurs et les dyskinésies chez les cas les plus difficiles (Balestrino & Schapira, 2020). Au niveau moléculaire, des études sur l'expression des transporteurs DAT et VMAT2 ont montré des réductions de la recapture de la DA au niveau des régions striatales présynaptiques (Okamura et al., 2010; Shen et al., 2012). Une altération de la disponibilité des Rc D_2 et D_3 dans les cerveaux des patients aurait également été observée (Stark et al., 2018).

Les nDA du MV, en particulier ceux de la substance noire, présentent une susceptibilité

accrue au stress oxydatif , aux troubles énergétiques et aux dysfonctionnements mitochondriaux (Lewers et al., 2008). La vulnérabilité de ces neurones à la dégénérescence pourrait également être liée à l'implication de facteurs essentiels dans la différenciation, le maintien et la survie des nDA (Prakash, 2022), notamment EN-1 et Pitx3 pour lesquels le polymorphisme génétique serait un risque potentiel important dans l'apparition de cas sporadique de la pathologie (Bergman et al., 2010; Fuchs et al., 2009; Haubenberger et al., 2011; Le et al., 2011). Chez le rongeur, l'inactivation de Lmx1a et Lmx1b reproduirait les défauts axonaux provoqués par l'inclusion de l'α-synucléine retrouvés dans la maladie de Parkinson (Doucet-Beaupré et al., 2016) et une diminution de LMX1B serait observée dans les nDA du mésencéphale de tissus cérébraux de patients atteints de la pathologie (Laguna et al., 2015). Des mutations affectant le gène NURR1 (aussi appelé NR4A2) pourrait également être associées à la maladie (Le et al., 2003; Sleiman et al., 2009).

3.2. Les dystonies

Les ganglions de la base et les perturbations de leurs voies sont impliqués dans d'autres pathologies motrices : les dystonies héréditaires ou d'origine génétique. En plus des ganglions de la base, le cortex, le thalamus et le cervelet ainsi que les réseaux les impliquant participent à la physiopathologie des dystonies (Balint et al., 2018; Brüggemann, 2021; Downs et al., 2019; H. A. Jinnah et al., 2017). Une diminution de la disponibilité des Rc D_2 dans le striatum et une augmentation de celle des Rc D_1 ont également été démontrées comme étant associées à certains types de ces dystonies (Asanuma et al., 2005; Karimi & Perlmutter, 2015; Simonyan et al., 2017).

3.3. Les troubles neuropsychiatriques

Le syndrome de Gilles de la Tourette (SGT)

Le SGT est un trouble neuropsychiatrique caractérisé par l'association de tics moteurs et vocaux. Il ne serait pas lié à une dégénérescence des ganglions de la base mais à un dysfonctionnement d'origine développementale notamment du putamen (Visser et al., 2000). En imagerie PET (tomographie par émission de positons) et SPECT (tomographie par émission monophotonique) les patients présentent une augmentation de la liaison au DAT accompagnée d'une augmentation du stockage de la DA et de sa libération dans le striatum,

et d'une diminution de la liaison au Rc D_2 dans certains cas (Nikolaus et al., 2009, 2022; Wong et al., 2008). Plusieurs hypothèses sur l'implication du système dopaminergique ont été émises et décrites dans la revue de Maia et Conceição 2018, la pathologie pourrait être due à : une hypersensibilité des Rc dopaminergiques, une dysfonction présynaptique avec une augmentation de la synthèse de la DA ou être la conséquence d'une hyperinnervation (une hypothèse basée sur les augmentations des transporteurs DAT et VMAT2 observées dans des études PET et SPECT chez des patients) avec une dérégulation de la transmission tonique et phasique de la DA. Plusieurs études d'imageries PET et SPECT se sont penchées sur l'observation des transporteurs DAT et VMAT2, ainsi que sur la synthèse et la libération de la DA et sur le Rc D_2 pour expliquer les symptômes de la pathologie (Maia & Conceição, 2018). L'hypothèse d'une hyperinnervation semble être la plus favorisée en intégrant différents éléments observés dans les différentes études sur la pathologie, avec plusieurs études qui ont montré une augmentation du DAT dans le putamen et le noyau caudé (ganglions de la base) chez des patients SGT, ainsi qu'une augmentation du VMAT2 (Maia & Conceição, 2018). De plus les traitements du SGT sont des molécules qui ont pour effet de diminuer la transmission dopaminergique (antipsychotiques antagonistes du Rc D_2) (Maia & Conceição, 2018).

La schizophrénie

La schizophrénie est un trouble psychiatrique caractérisé par un ensemble de symptômes avec trois composantes principales : des symptômes positifs (comme des hallucinations), des symptômes négatifs (avec par exemple un retrait social, baisse de la motivation ou de la parole) et des troubles cognitifs (Owen et al., 2016). Dans des études d'immunohistochimie conduites sur des échantillons post-mortem de coupes de SN et de VTA de patients et de contrôles, il a été observé des perturbations des voies mésocorticostriatales (Rice et al., 2016). En plus de ces études, il a été observé au niveau des zones corticales, par de la neuroimagerie chez l'Homme en PET ou SPECT, un état hypodopaminergique avec une diminution de la libération de DA associée à une diminution de la détection de la TH tandis qu'au niveau striatal il a été observé une augmentation de la synthèse de la DA notamment chez les nDA de la substance noire ainsi qu'une augmentation de la libération de la DA (Grace, 2016; Howes et al., 2017; Rice et al., 2016; Weinstein et al., 2017). Cette dérégulation est en partie liée au système de régulation de la transmission tonique et phasique dopaminergique, la baisse de DA au niveau du cortex entrainerait une activation des neurones excitateurs glutamatergiques qui vont stimuler la

synthèse et la libération de DA au niveau du striatum avec une augmentation de la détection de TH (Grace, 2016; Howes et al., 2017). La diminution corticale de DA va également entrainer une diminution de libération du GABA par les interneurones via une hypoactivation des Rc NMDA (Howes et al., 2017). Associés à cette dérégulation, sont observés une augmentation de la disponibilité des Rc D_2 au niveau du striatum suggérant une hypersensibilité à la DA ainsi que des polymorphismes au niveau du gène codant pour les Rc D_2 et pour des gènes impliqués dans la régulation en amont de la synthèse de la DA (Howes et al., 2017; Kegeles et al., 2010; Seeman, 2013).

Le trouble du déficit de l'attention avec ou sans hyperactivité (TDAH)

Le TDAH est un trouble psychiatrique neurodéveloppemental fréquent en pédiatrie. Il se manifeste par un ensemble de symptômes : des difficultés de concentration, de l'agitation, de l'inattention, une impulsivité associée ou non à une hyperactivité motrice et une hyperactivité. Chez l'Homme certains gènes spécifiques sont associés aux TDAH notamment ceux codant pour la signalisation dopaminergique, le DAT ou encore ceux codants pour les Rc D_4 et D_5 pour lesquels des polymorphismes ont été associés à ces troubles (Gizer et al., 2009; Hasler et al., 2015; Klein et al., 2019; Sakrikar et al., 2012). En France, une molécule est autorisée pour le traitement médicamenteux des TDAH : le méthylphénidate, qui agirait en bloquant la recapture de la dopamine et de la noradrénaline et augmenterait leur concentration dans la synapse (Source : https://www.vidal.fr/medicaments/substances/me-thylphenidate-6226.html).

Autres exemples de troubles neuropsychiatriques et phénomènes d'addiction

Les nDA et la transmission dopaminergique seraient également impliqués dans d'autres troubles neuropsychiatriques comme la dépression, les troubles bipolaires ou encore les troubles du spectre autistique (Ashok et al., 2017; Beaulieu & Gainetdinov, 2011; Grace, 2016; Hamilton et al., 2013; Pavăl, 2017). Dans certains cas de dépression, il a été observé des perturbations de la liaison au RC D_2 dans les ganglions de la base (Beaulieu & Gainetdinov, 2011; Grace, 2016), Pour les troubles du spectre autistique, l'hypothèse émise est que les symptômes seraient entrainés par un dysfonctionnement des voies mésocorticolimbiques associé à des perturbations de l'homéostasie dopaminergique notamment via le transporteur DAT (Hamilton et al., 2013; Pavăl, 2017). Le circuit mésolimbique est impliqué dans les

comportements liés à la récompense. Il serait en cause dans les phénomènes d'addiction liées à l'usage de drogues ou aux addictions associées au comportement alimentaire qui résultent d'un déséquilibre du système dopaminergique, liée à une suractivation de celui-ci provoqué par la prise de ces substances ou aliments (Baik, 2013; Kenny et al., 2013; Klein et al., 2019).

Enfin, l'ensemble des symptômes moteurs ainsi que plusieurs études vont dans le sens d'une implication des nDA dans une pathologie neurodéveloppementale rare, la maladie de Lesch-Nyhan qui sera décrite dans le Chapitre 3.

Pour pouvoir étudier le développement de ces neurones et explorer les mécanismes d'apparition de ces pathologies, il est nécessaire de pouvoir modéliser leur développement. Pour cela il existe un outil : les cellules souches pluripotentes humaines.

Chapitre 2 : Les cellules souches pluripotentes humaines : un outil de modélisation des nDA

1. Définitions

Ces dernières décennies de nouveaux « outils » ont été développés afin d'étudier les mécanismes du développement humain et physiopathologiques : les cellules souches pluripotentes (CSP, CSPh pour les cellules pluripotentes humaines). Les cellules souches pluripotentes sont capables en se différenciant de donner les trois feuillets embryonnaires que sont le mésoderme, l'endoderme et l'ectoderme. Elles se différencient ainsi des cellules souches dites totipotentes, capables de former tous les types de cellules embryonnaires ainsi que les structures extra-embryonnaires, et des cellules souches multipotentes, capables elles de se différencier dans un lignage cellulaire précis d'un feuillet embryonnaire (Tabansky & Stern, 2016). Les CSP sont définies par deux caractéristiques : la pluripotence, déjà évoquée, et l'auto-renouvellement. Ces cellules sont capables de se multiplier et d'être maintenues en culture en théorie indéfiniment.

Il existe deux types de CSPh, les cellules souches embryonnaires humaines (hESC) et les cellules souches humaines induites à la pluripotence (hiPSC).

2. Les deux types de CSPh

2.1. Les cellules souches embryonnaires humaines (hESC)

Découverte et origine

C'est d'abord chez la souris qu'il a été démontré qu'il était possible d'isoler des cellules souches pluripotentes à partir d'embryon à un stade précoce du développement : le stade blastocyste. Il a été observé chez ces cellules, un comportement similaire à celui des cellules de carcinomes embryonnaires isolées à partir de tératocarcinomes (Evans & Kaufman, 1981). Les tératocarcinomes sont des tumeurs malignes composées entre autres de cellules indifférenciées capables de se différencier dans les trois feuillets embryonnaires. Lorsque ces cellules issues de blastocystes murins ont été réinjectées à des souris adultes, elles se sont différenciées en tératocarcinomes, montrant ainsi leur capacité à la pluripotence (Evans &

Kaufman, 1981). Cette capacité de pluripotence a été retrouvé *in vitro*, après différenciation en plusieurs types cellulaires de cellules souches embryonnaires de souris issues de blastocystes (Martin, 1981). De plus, comme les cellules de carcinomes embryonnaires, les cellules pluripotentes issues des blastocytes de souris sont capables de proliférer rapidement, d'être maintenues en culture *in vitro* sur plusieurs passages et de former des agrégats sphériques appelés corps embryoïdes (EB) quand celles-ci sont cultivées sans cellules de support (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981). Elles présentent en revanche un caryotype normal contrairement aux cellules de carcinomes (Evans & Kaufman, 1981). Cela a permis d'envisager la possibilité de pouvoir étudier le développement grâce aux cellules souches pluripotentes embryonnaires.

Les premières lignées humaines de cellules souches embryonnaires (hESC) ont été décrites par James A. Thomson et son équipe en 1998 (Thomson et al., 1998). Chez l'homme, les hESC sont prélevées à partir de la masse cellulaire interne (MCI) du blastocyste entre le cinquième et le septième jour du développement embryonnaire (Source : https://www.inserm.fr/dossier/cellules-souches-embryonnaires-humaines/) (Thomson et al., 1998), après une fécondation in vitro (Figure 12). Environ 24 heures après la fécondation, le zygote va subir des divisions segmentaires, chaque cellule est alors appelée blastomère. Le volume de l'embryon reste le même tout au long de ses divisions car défini par la zone pellucide. Au bout d'environ 96 heures de division, la trentaine de cellules formées par les divisions segmentaires successives donnent à l'embryon son nom de morula. Une cavité de liquide intracellulaire, le blastocœle, va se former dans l'embryon. Les cellules les plus externes de la morula forment alors le trophoblaste et les cellules plus internes : l'embryoblaste ou masse cellulaire interne. L'ensemble est appelé blastocyste (Source : https://embryology.ch/fr/embryogenese/preimplantation/).

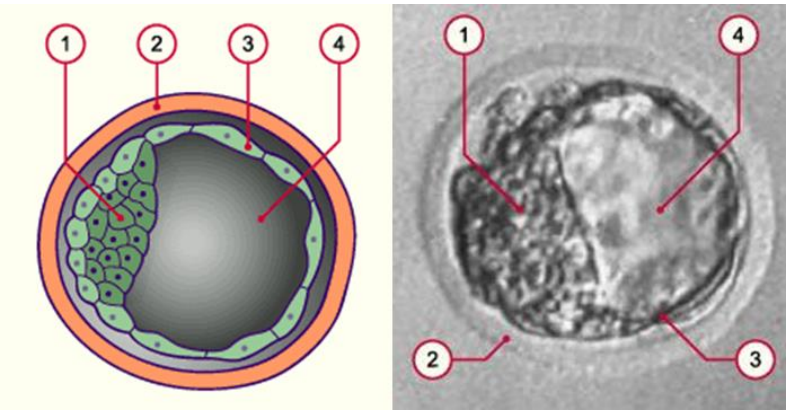


Figure 12 : Schéma et photographie d'un blastocyste au stade 5e jour.

Le blastocyste, au 5e jour du développement embryonnaire chez l'Homme, est composé de (1) la masse cellulaire interne ou embryoblaste, (2) de la zone pellucide, (3) du trophoblaste et (4) du blastocœle. (Source : site https://embryology.ch/fr/embryogenese/; © Dr. A. Senn et al, CHUV Lausanne).

Les hESC proviennent d'embryons surnuméraires obtenus au cours d'une fécondation *in vitro* dans le cadre d'assistance médicale à la procréation. Ces blastocytes ont été cédés pour la recherche après consentement éclairé et écrit du couple concerné ayant décidé de mettre fin à leur projet parental (De Sousa et al., 2016; Tannenbaum et al., 2012; Thomson et al., 1998). Les lignées hESC porteuses de mutations génétiques sont elles issues de blastocystes porteurs de la mutation, cédés avec accord à la recherche à la suite de diagnostic pré-implantatoire (DPI) (Mateizel et al., 2006; Pickering et al., 2005). Pour illustrer, il existe plus de 6 000 maladies génétiques identifiées et beaucoup d'entre elles sont rares. En France en 2020, l'analyse en DPI était possible pour 366 maladies génétiques (Source : https://rams.agence-biomedecine.fr/indications-disponibles-pour-un-diagnostic-preimplantatoire-en-france-0).

Les cellules souches embryonnaires : une recherche très encadrée

Du fait de leur origine, l'utilisation des hESC soulève des questionnements éthiques. En France, l'utilisation des cellules souches embryonnaires humaines est encadrée par l'Agence de Biomédecine (ABM). Cette agence nationale a été créée lors de la première loi n° 2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique révisée le 2 août 2021.

Depuis juillet 1994, la première loi de bioéthique, l'ABM encadre certaines activités médicales et de recherche en tenant compte des progrès scientifiques. Cette loi a été revue en

2004, en 2011, 2013 et dernièrement en 2021. C'est lors de la troisième révision, que la loi du 6 août 2013 inscrit la recherche sur les cellules souches embryonnaires humaines dans un régime d'autorisation encadré (Source : https://www.agence-biomedecine.fr/Bioethique-biomedecine-pourquoi-comment-encadrer-la-medecine). Le recherche sur le hESC est alors soumise à un régime de dérogation et ne peut être effectuée que pour certaines raisons : permettre de faire progresser la connaissance du développement humain, comprendre les mécanismes biologiques qui caractérisent les cellules et dans la perspective de nouvelles approches thérapeutiques comme la thérapie cellulaire. Depuis la révision de 2021, qui encadre notamment le DPI, l'ABM autorise et contrôle la recherche sur l'embryon humain, les déclarations de recherche sur les hESC. L'ABM délivre les autorisations concernant les différentes demandes suivantes : les protocoles de recherche sur l'embryon humain (article L. 2151-5), l'importation et l'exportation de hESC à des fins de recherche (article L. 2151-8), la conservation à des fins de recherche des embryons humains (article L.2151-9) dans un laboratoire médicale autorisé (Source : https://www.agence-biomedecine.fr/Recherches-sur-l-embryon-humain-et-les-cellules-souches-embryonnaires-humaines).

La loi n°2021-1017 du 2 août 2021 relative à la bioéthique modifie le cadre juridique appliqué à la recherche sur les hESC et le sépare de celui de la recherche sur l'embryon humain. Les recherches sur les hESC ainsi que leur conservation sont maintenant soumises à un système de déclaration auprès de l'ABM, avec toutefois les précisions suivantes :

- La création d'embryons pour la recherche est interdite.
- L'introduction des cellules d'une autre espèce dans un embryon humain est interdite.
- La durée de culture de l'embryon humain ne peut pas excéder 14 jours.

La culture des hESC nécessite la plupart du temps la destruction de l'embryon (Cowan et al., 2004; Klimanskaya et al., 2006; Reubinoff et al., 2000), ce qui peut également soulever des questionnements éthiques pour leur utilisation en recherche dans certains pays. Des études ont montré, d'abord avec des blastocystes de souris (Y. Chung et al., 2006), puis des blastocystes humains qu'il était possible d'utiliser une méthode alternative pour dériver des hESC à partir d'un seul blastomère grâce à une méthode permettant d'effectuer une sorte de biopsie pour prélever une cellule (méthode ressemblant à celle utilisée pour les DPI) sans

détruire l'embryon (Y. Chung et al., 2008; Klimanskaya et al., 2006).

En plus des questionnements éthiques liés à l'utilisation des cellules hESC, l'obtention de telles cellules est en pratique compliquée. Le hESC doivent être prélevées de la MCI a un temps bien précis. Dans le cadre d'études pathologiques il est nécessaire d'isoler les cellules d'embryons issus de DPI porteurs de la mutation d'intérêt identifiée. Dans le cadre de maladies rares, cette option n'est pas toujours présente. Il existe aujourd'hui plus d'une centaine de lignées de hESC provenant d'embryons porteurs de mutations monogéniques ou d'aberrations chromosomiques (Ilic & Ogilvie, 2017). La plupart sont référencées dans les registres : NIH hESC Registry et Human Pluripotent Stem Cell Registry. Parmi les lignées, les mutations entrainant les pathologies suivantes sont les plus retrouvées : la maladie de Huntington, le syndrome du X fragile, fibrose cystique, la dystrophie myotonique, la maladie de Charcot-Marie-Tooth (Ilic & Ogilvie, 2017).

A peu près à la même période que l'autorisation des hESC en France, un autre type de cellules souches pluripotentes humaines a été décrit et constitue une alternative à l'utilisation de lignées hESC : les cellules souches humaines induites à la pluripotence.

2.2. Les cellules souches humaines induites à la pluripotence (hiPSC)

Les hiPSC sont des cellules souches pluripotentes qui ont été reprogrammées à partir de cellules différenciées comme par exemple des fibroblastes ou des cellules mononuclées du sang périphérique (Karagiannis et al., 2019). En 1962, il a été montré chez la grenouille qu'il était possible de reprogrammer des cellules matures par transfert nucléaire (Figure 13). Dans ces travaux John Gurdon décrit, qu'en transférant des noyaux de cellules intestinales différenciées de têtard dans des ovocytes non fécondés (à la place du noyau), il avait été possible d'obtenir le développement de têtards et même de grenouilles adultes (Gurdon, 1962). Plusieurs dizaines d'années plus tard, Ian Wilmut et son équipe ont présenté leur travaux : la naissance du mouton Dolly, premier mammifère cloné né après transfert de l'information génétique contenue dans des cellules mammaires épithéliales dans des ovocytes non fertilisés (Wilmut et al., 1997). Ces travaux ont pu démontrer que l'état différencié des cellules somatiques n'impliquait pas son irréversibilité, et que ces cellules possédaient les informations génétiques pour se différencier dans tous les types de cellules et former un organisme entier et viable. De plus, ces travaux ont également pu démontrer qu'il devait y avoir

les facteurs nécessaires à l'inversion de l'état différencié à l'intérieur des ovocytes (Yamanaka, 2012).

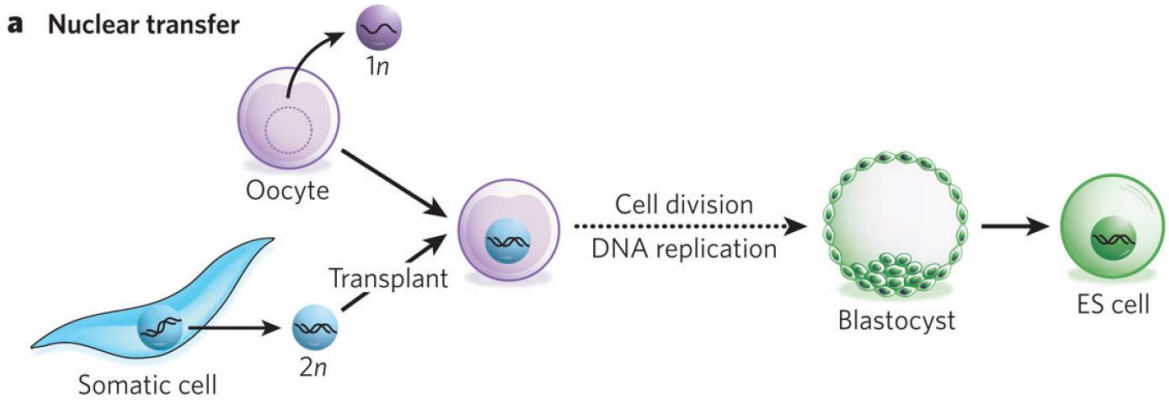


Figure 13 : Schéma de la reprogrammation de cellules somatiques en cellules pluripotentes par l'approche de transfert nucléaire.

(Source : Yamanaka & Blau, 2010).

En combinant ces découvertes avec celles sur la culture des ES de souris et humaines (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981; Smith et al., 1988; Thomson et al., 1998), c'est une dizaine d'années plus tard que Kazutoshi Takahashi et Shinya Yamanaka décrivent pour la première fois les hiPSC. Ils ont montré qu'il était possible de reprogrammer des fibroblastes embryonnaires et adultes de souris en cellules souches pluripotentes en introduisant quatre facteurs grâce à des rétrovirus : Oct3/4, Sox2, Klf4 et c-Myc (K. Takahashi & Yamanaka, 2006). L'année suivante, K. Takahashi et al., 2007, montrent qu'il est possible grâce à la même approche chez l'Homme et le même cocktail de facteur de reprogrammation d'induire l'état de pluripotence à partir de fibroblastes et d'autres cellules somatiques humaines (Figure 15). La même année, Yu et al., 2007 publient également leurs résultats. Ils montrent eux aussi qu'il est possible d'induire l'état de pluripotence en transférant dans le noyau de cellules différenciées des facteurs présents dans l'ovocyte. La différence avec l'équipe de Yamanaka est la composition des quatre facteurs choisis : OCT4, SOX2, NANOG, and LIN28 (Yu et al., 2007).

Les hiPSC ressemblent aux hESC non seulement pour leurs caractéristiques de pluripotence et d'auto-renouvellement, mais également d'un point de vue morphologique. Les

deux types de CSPh sont caractérisées par un rapport nucléocytoplasmique élevé avec des nucléoles de tailles importantes et un cytoplasme peu étendu. Elles se regroupent en colonies arrondies compactes aux bords clairs et lisses (Figure 16) (K. Takahashi et al., 2007). Les hiPSC sont comparables aux hESC sur leur capacité de différenciation *in vitro*, leur morphologie et sur leur capacité à former les trois feuillets embryonnaires en se différenciant en tératomes *in vivo* (K. Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). Elles possèdent également les mêmes antigènes de surface et une activité télomérase semblable signe de la capacité de prolifération. Les quatre rétrovirus sont « silencieux » dans les hiPSC attestant de la bonne reprogrammation des cellules. Les cellules n'ont donc pas besoin de l'activation en continu des des facteurs pour maintenir leur état et proliférer (K. Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). Pour leurs découvertes sur le fait que des cellules matures et spécialisées puissent être reprogrammées en cellules immatures et pluripotentes pour la différenciation, John B. Gurdon et Shinya Yamanaka ont été récompensés par le Prix Nobel de Physiologie ou de Médecine en 2012.

Plusieurs méthodes ont été développées et testées par la suite pour la reprogrammation. Parmi elles, il y a des méthodes intégratives pour lesquelles les séquences qui codent pour les facteurs de la pluripotences sont intégrées au génome des cellules somatiques (Moradi et al., 2019) et des méthodes non intégratives (Figure 14). Pour ces dernières, elles permettraient de produire des hiPSC avec une plus grande sécurité pour des applications médicales comme la thérapie cellulaire (Moradi et al., 2019). On retrouve comme méthodes non intégratives : des plasmides, des ARN de synthèse, des adénovirus, et le virus Sendai (Fusaki et al., 2009; Karagiannis et al., 2019; Moradi et al., 2019; Okita et al., 2008, 2011; Yamanaka, 2012). Le virus Sendai est le plus souvent retrouvé pour l'induction des hiPSC.

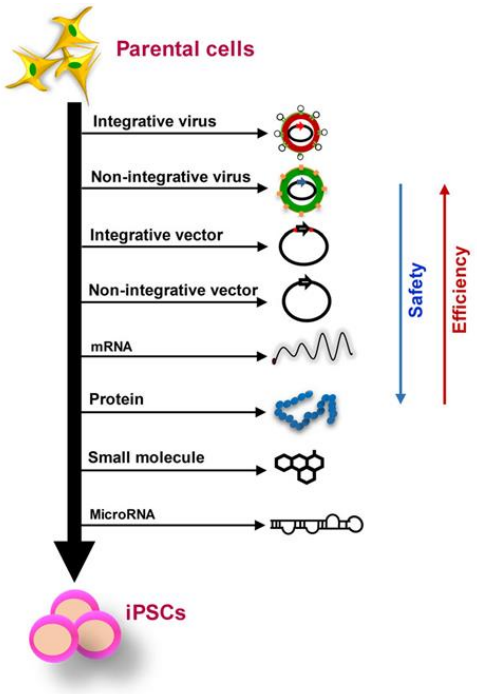


Figure 14 : Différentes approches utilisées pour la reprogrammation des cellules somatiques en hiPSC.

(Source : Moradi et al., 2019).

Bien qu'elles ne soient pas d'origine embryonnaire il existe quand même un cadre légal à l'utilisation des hiPSC en recherche. Par exemple, il est nécessaire d'avoir le consentement écrit et révocable du donneur ou du patient pour le don des cellules somatiques, il faut également effectuer un suivi des lignées hiPSC et des cellules différenciées à partir de celle-ci (Moradi et al., 2019). Il existe des recommandations comme celles de l'European Bank for induced Pluripotent Stem Cells pour de bonnes pratiques de la gestion des données liées à l'utilisation des hiPSC (Steeg et al., 2021).

Les capacités de pluripotence et d'auto-renouvellement des CSPh, ont permis d'ouvrir la voie pour diverses applications en recherche et mais également le domaine médical (Figure 18). Il est donc nécessaire d'en contrôler la culture et la différenciation.

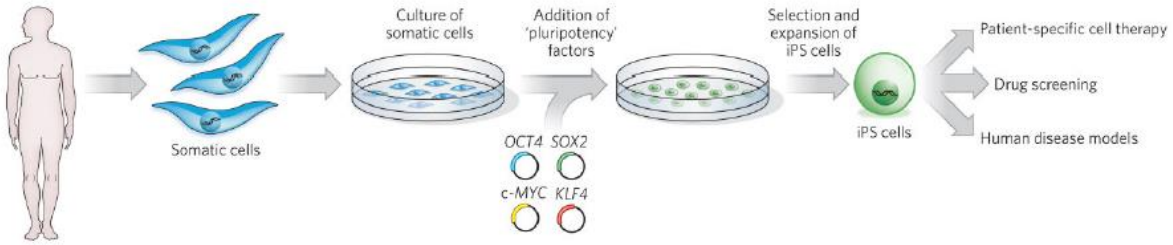


Figure 15 : Schéma de la méthode de reprogrammation des cellules somatiques en hiPSC avec les quatre facteurs de Yamanaka et exemples d'applications.

(Source : Yamanaka & Blau, 2010).

3. Les CSPh en culture *in vitro* et leur caractérisation

3.1. Culture des CSPh

Historiquement la culture des hESC s'effectuait sur des matrices de cellules nourricières, les MEF, des fibroblastes embryonnaires murins inactivés pour la mitose par la mitomycine-C ou les rayonnements γ (Martin & Evans, 1975; Reubinoff et al., 2000; Thomson et al., 1998). Il avait également été décrit que l'ajout d'une interleukine humaine, le LIF (Leukemia inhibitory factor), permettait la culture à long terme des ESC de souris en empêchant la différenciation des cellules souches embryonnaires de souris (Smith et al., 1988; R. L. Williams et al., 1988). Les milieux de culture utilisés contenaient entre autres des composés dérivés d'animal comme du sérum de veau fœtal (BSA) ou des milieux conditionnés par des cultures de MEF (G. Chen et al., 2011). Des travaux ont montré qu'il était possible de remplacer la BSA par du sérum d'origine humaine pour cultiver les hESC (Richards et al., 2002). Toutefois l'utilisation de sérum présente des limites, il est difficile en effet d'obtenir une composition identique entre les différents lots. Il a dans un premier temps été remplacé par de l'albumine puis celle-ci a également été retirée de la composition (Dakhore et al., 2018). Depuis plusieurs milieux pour une culture optimale ont été établis sans sérum, ni albumine, avec des facteurs de croissance tel que le Fgf2 et des cytokines comme du TGFβ pour faciliter la culture des CSPh en recherche et pour de futures applications cliniques (G. Chen et al., 2011; Levenstein et al., 2006).

Actuellement, la culture des CSPh s'effectue en routine sur un « coating » de vitronectine (VTN) , une glycoprotéine présente dans les matrices extracellulaires utilisée en culture sous

forme recombinante (Braam et al., 2008). Pour remplacer les MEF, plusieurs types de matrices ont été utilisées : collagène purifié de type IV, laminine, fibronectine, VTN recombinante, Matrigel (Draper et al., 2004). La VTN et le Matrigel se sont avérés être les plus adaptés pour la prolifération de CSPh (Braam et al., 2008).

Aujourd'hui, la recherche autour de l'optimisation des protocoles de culture des hESC et hiPSC a pour but de pouvoir produire des cultures de CSPh de grade GMP* (De Sousa et al., 2016; Kropp et al., 2016; Rivera et al., 2020; J. Ye et al., 2017), dans le but d'avoir des pratiques permettant d'obtenir des lignées de qualité homogène pour du « banking » mais également des protocoles de culture transférable en clinique notamment pour la thérapie cellulaire (ainsi que les applications développées dans le sous-chapitre suivant) avec des méthodes de culture dites « xeno-free » sans composés d'origine animale dans la matrice ou le milieu (Amit & Itskovitz-Eldor, 2006; Dakhore et al., 2018; De Sousa et al., 2016; Rivera et al., 2020; J. Ye et al., 2017).

Une fois en culture, les CSPh vont proliférer et se compacter en colonies (Figure 16). Avant que la densité ne devienne trop importante et provoque une différenciation spontanée des CSPh, il est nécessaire de passer les cellules sur un nouveau support de culture à plus faible densité, pour de l'amplification par exemple. Pour « décoller les cellules » il existe plusieurs techniques. Les cellules peuvent être passées manuellement par découpage à l'aiguille des zones à passer après un « nettoyage » des zones de différenciation si besoin. Cette méthode est longue et peu adaptée pour de la culture cellulaire à plus grande échelle ou GMP*. Pour dissocier les cellules, il existe plusieurs méthodes enzymatiques, telles que l'accutase™ ou le TrypLE™, ou chimiques. Toutefois, la dissociation enzymatique des cellules a été associée à une augmentation de la prolifération et une instabilité génomique plus importante (Garitaonandia et al., 2015). Des méthodes de dissociation non-enzymatique, comme l'utilisation d'acide éthylène-diamine-tétra-acétique ou EDTA (Beers et al., 2012), ont également été développées. Lors de la décongélation ou la dissociation des cellules, l'ajout dans le milieu de ROCK inhibitor ou y-27632 permet de protéger les cellules de l'apoptose induite par la dissociation et de diminuer la mortalité cellulaire (Watanabe et al., 2007).

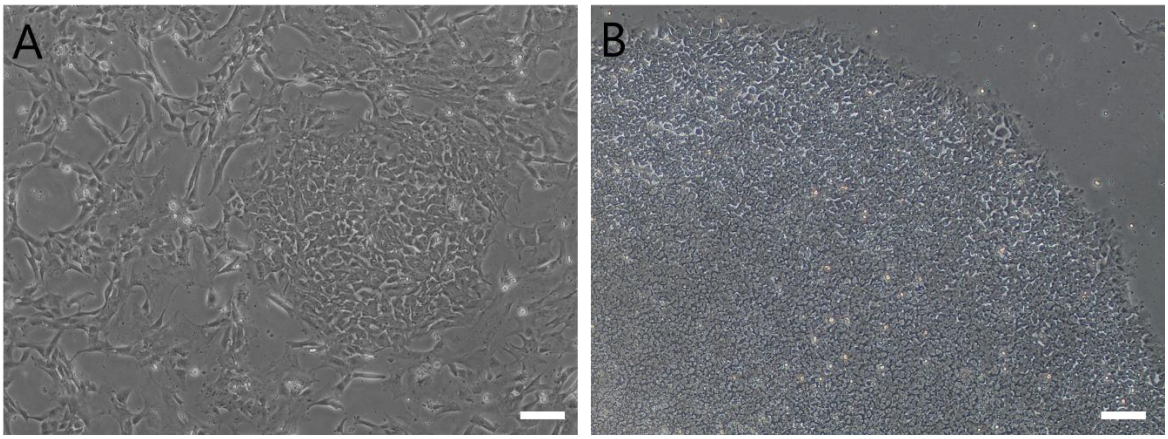


Figure 16 : Exemple de cellules hESC en culture in vitro.

Exemple de colonies de cellules hESC en formation (A) et avant passage (B) en culture sur un « coating » de VTN recombinante (A) et (B). (Sources : Données personnelles).

3.2. Caractéristiques des CSPh

Pluripotence

Lorsque les CSPh sont en culture in vitro, les premières vérifications peuvent être le contrôle visuel de la prolifération des cellules et l'absence de différenciation. Comme décrit précédemment il est déjà possible de vérifier leur aspect morphologique : rapport noyau/cytoplasme élevé et regroupement en colonies compactes aux bords bien définis (Figure 16). Lorsque des cellules d'aspect plus allongé ou que les tapis cellulaires sont trop épais cela peut être ou entraîner de la différenciation. Il est donc nécessaire d'effectuer un nettoyage des cellules qui semblent être différenciées.

Pour contrôler l'état de pluripotence des lignées de CSPh il y a deux techniques. La première *in vivo*, les cellules forment des tératomes contenant les trois feuillets de cellules différenciées (endoderme, mésoderme et ectoderme) lorsqu'elles sont greffées chez une souris immunodéficiente (Figure 17B). La seconde méthode de vérification, *in vitro*, est la capacité à former des EB en culture (Figure 17A) sans matrice sous l'influence de cytokines en début de différenciation (K. Takahashi et al., 2007).

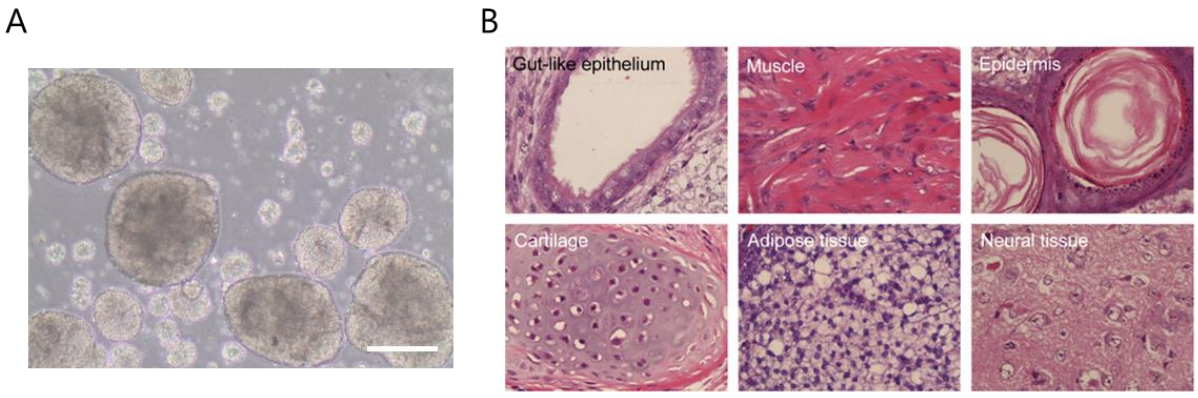


Figure 17 : Exemple du contrôle du caractère de pluripotence des CSPh.

(A) Les CSPh forment des agrégats en 3D in vitro lors d'une induction sous l'influence de cytokines dans le milieu. Barre d'échelle : 200µm. (Source : Données personnelles). (B) in vivo, les CSPh forment des tératomes contenant les trois feuillets cellulaires lorsque greffés chez la souris immunodéficiente. (Source : K. Takahashi et al., 2007).

Pour contrôler l'état de pluripotence il est également possible de vérifier l'expression des marqueurs membranaires de la pluripotence en cytométrie en flux : Oct-4, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, et des marqueurs intracellulaires : SOX2, Nanog et OCT4. En plus grâce à l'immunofluorescence il est possible de contrôler l'expression des gènes de la pluripotence en marquant SOX2, Nanog et OCT4 (Sullivan et al., 2018; K. Takahashi et al., 2007).

Contrôle du maintien de l'intégrité génomique

Il est important de vérifier l'intégrité génomique des cellules. En effet, un des risques de l'application des CSPh en clinique est la tumorigénicité. Elle est liée au caractère prolifératif des cellules et au fait que lors des passages successifs les cellules peuvent acquérir des mutations et des aberrations chromosomiques. Ce risque est d'autant plus élevé avec les hiPSC car en plus des aberrations qu'elles peuvent acquérir au cours de la culture elles peuvent également posséder les mutations acquises par les cellules somatiques de départ et celles qui pourraient résulter des méthodes de reprogrammation (Ben-David & Benvenisty, 2011; de Almeida et al., 2013). Pour contrôler ces anomalies, il faut réaliser un caryotypage des cellules ou l'analyse des SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) (Assou et al., 2018; Lefort et al., 2009; Steichen et al., 2019). Les anomalies les plus fréquemment rencontrées lors des contrôles sont les aneuploïdies, soit une perte ou un gain de chromosome, des variations d'un nucléotide ou des

CNV (copy number variation) (Henry et al., 2018; Steichen et al., 2019). Il existe également un risque d'un silencing incomplet des gènes de la pluripotence avec une réactivation de ceux-ci (Lee et al., 2013). Parmi les mutations les plus fréquemment retrouvées, il y a la duplication en 20q11.21 qui confère aux cellules un avantage sélectif avec une transformation oncogénique des cellules qui se traduit par un état prolifératif et une difficulté à se différencier correctement (Avery et al., 2013; Lefort et al., 2008). On retrouve également les mutations du gène TP53, un gène « suppresseur de tumeur », qui lorsqu'il est muté peut également donner aux cellules un avantage sélectif (Merkle et al., 2017).

En plus du risque de tumorigénicité, il y a une autre limite pratique à l'utilisation des CSPh : l'hétérogénéité. En effet, il existe des variations entre les lignées liée au fond génétique de chacune. Cette hétérogénéité pourrait avoir un impact pour leur utilisation notamment en clinique. Certaines lignées hiPSC par exemple auraient des variations dans leur potentiel de différenciation en fonction du lignage (Yamanaka, 2012, 2020).

4. Les différentes applications des CSPh en recherche

La découverte des hESC et des hiPSC ont provoqué une révolution dans le monde la recherche. En effet, jusqu'à leur arrivée, la recherche sur les différents types cellulaires était réalisée sur des échantillons de tissus ou des cultures de cellules primaires ou immortalisées. Des échantillons qui pouvaient être limités en termes de quantité ou d'accès pour certains types de cellules comme c'est le cas pour les neurones. Grâce à leurs caractéristiques, les CSPh permettent en théorie d'obtenir tous les types cellulaires d'un organisme et de modéliser leur développement. Elles peuvent également proliférer à l'infini et permettre d'obtenir des quantités de cellules importantes congelables pour la recherche. De plus elles offrent une alternative à l'utilisation de modèles animaux qui soulève de nombreuses questions éthiques.

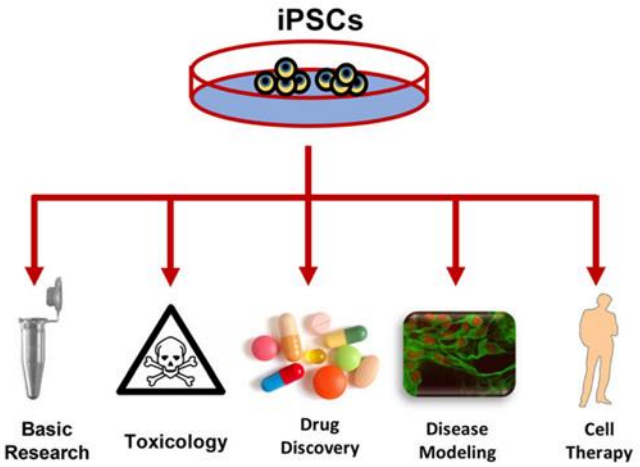


Figure 18 : Applications potentielles des CSPh dans le domaine biomédical.

(Source : Moradi et al., 2019).

4.1. La modélisation physiopathologique

Il existe plusieurs applications au CSPh pour la recherche fondamentale ou clinique et la médecine (Figure 18). La différenciation des CSPh en cellules d'intérêt grâce aux développements de protocoles spécifiques permet d'obtenir des modèles cellulaires d'intérêt. Ils permettent d'explorer les conséquences de mutations dans n'importe quel type de cellules (Yamanaka & Blau, 2010). Le principe de ces protocoles est de récapituler les étapes du développement des cellules d'intérêt. Il est alors possible d'aller étudier les mécanismes moléculaires à l'origine des phénotypes des maladies comme les pathologies neurodéveloppementales ou neurologiques par exemple (Benchoua et al., 2021; M. J. Devine et al., 2011; Sutcliffe et al., 2021; L. A. Williams et al., 2012). De plus, les hiPSC peuvent être induites à partir de cellules somatiques de patients, il est donc possible de modéliser différents types de cellules à partir de ces hiPSC spécifiques d'une pathologie en conservant le fond génétique et d'aller étudier les conséquences d'une mutation sur un autre type de cellules que celles atteintes en premier lieu. Par exemple, il est possible d'aller étudier les conséquences d'une mutation provoquant une myopathie sur le développement des neurones, comme la myopathie de Duchenne dans laquelle on retrouverait également des atteintes neurologiques.

Il existe des protocoles pour la différenciation des différents types de cellules neurales (Silva & Haggarty, 2020), neurones ou cellules gliales, soit en utilisant des milieux contenant

des cytokines et des facteurs de croissance spécifiques soit par des méthodes de conversion directe. C'est le cas pour les nDA (Kirkeby et al., 2012; Kriks et al., 2011; Theka et al., 2013), les neurones sérotoninergiques (Kumar et al., 2009; Lu et al., 2016), les neurones GABAergiques (Y. Liu et al., 2013; Maroof et al., 2013; Sun et al., 2016; N. Yang et al., 2017), les neurones corticaux (Boissart et al., 2013; Qi et al., 2017), les motoneurones craniaux ou spinaux (Hester et al., 2011; Maury et al., 2015), des photorécepteurs de la rétine (Ben M'Barek et al., 2015), des neurones pyramidaux de l'hippocampe (Sarkar et al., 2018), des neurones hypothalamiques (Rajamani et al., 2018), les astrocytes (Bradley et al., 2019; Canals et al., 2018; Leventoux et al., 2020), la microglie (Fattorelli et al., 2021; Muffat et al., 2016) et les oligodendrocytes (Espinosa-Jeffrey et al., 2016; S. Wang et al., 2013).

Il est également possible grâce à des méthodes d'édition du génome, comme la technologie CRISPR, de créer des modèles d'études d'une pathologie en insérant la mutation d'intérêt dans le génome des CSPh et d'aller en étudier les conséquences sur la différenciation et les phénotypes des cellules. Cette technologie permet également de corriger des mutations (Giacalone et al., 2018).

4.2. La thérapie cellulaire

Une autre application pour les CSPh est la thérapie cellulaire. En effet, les CSPh peuvent être différenciées en cellules qui serviront à remplacer des cellules altérées chez les patients. Il existe toutefois des risques liés à la nature des CSPh : le risque de rejet immunitaire, de tumorigénicité et d'hétérogénéité en fonction des cellules (Henry et al., 2018; Yamanaka, 2020). Pour le risque immunitaire, il est possible de créer des banques de cellules HLA-typées, c'est-à-dire qu'avec des hiPSC provenant d'un petit nombre de donneurs d'un certain type HLA on pourrait envisager de traiter un grand nombre de patients. Il existe deux types de banque de ce style (Yamanaka, 2020), une au Royaume-Uni crée à partir des hiPSC de 150 donneurs volontaires qui peut être compatible avec 93% de la population (Taylor et al., 2012), et une au Japon (Okita et al., 2011). Il existe aujourd'hui plusieurs essais cliniques en cours à partir de CSPh concernant par exemple la dégénérescence maculaire liée à l'âge (Mandai et al., 2017; Mehat et al., 2018), le diabète de type 1 (Ilic & Ogilvie, 2017), la maladie de Parkinson (J. Takahashi, 2020) ou encore d'autres pathologies (Figure 19).

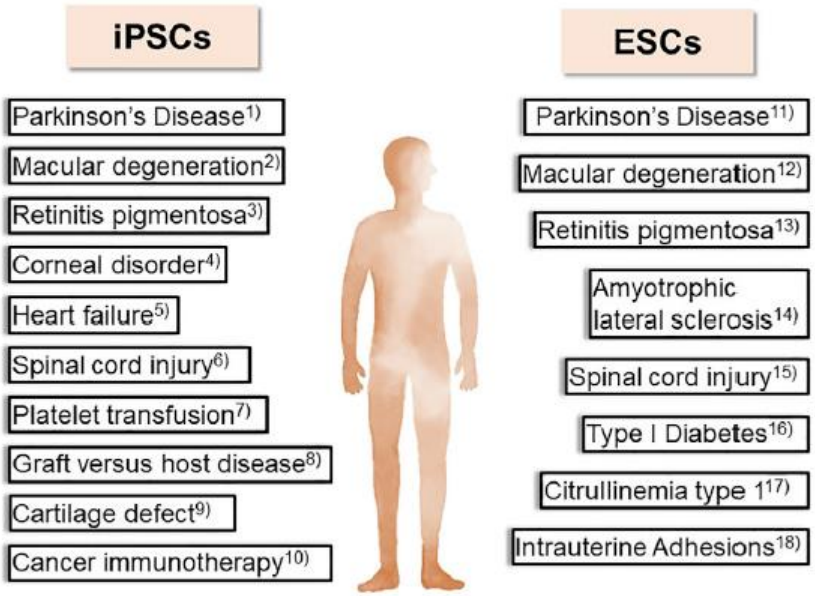


Figure 19 : Schéma montrant les essais cliniques existants pour des thérapies dérivées de CSPh en 2020.

Ces essais ont été trouvés sur UMIN ClinicalTrials Registry (https://www.umin.ac.jp/ctr/index.htm) ou sur ClinicalTrials.gov (https://clinicaltrials.gov/ct2/home). (Source : Yamanaka, 2020).

4.3. Le drug screening

Les modèles dérivés de CSPh peuvent également être utilisés pour du criblage à haut débit ou HTS. Cette approche pharmacologique permet de tester de façon automatisée et systématique des banques de composés appelées chimiothèques pouvant contenir plusieurs centaines ou milliers de molécules, le tout en parallèle. Les banques peuvent être composés de molécules chimiques de synthèse, de composés naturels ou encore des molécules à l'effet thérapeutique déjà connu. Le HTS nécessite des modèles cellulaires en quantité importante nécessaire pour le test de ces composés ainsi que des protocoles de production de ces modèles robustes et reproductibles. En combinant cette technologie à celle des CSPh, il est possible de cribler des molécules d'intérêt thérapeutique sur une grande quantité de cellules et d'avoir des modèles cellulaires humains avec des corrélations génotype-phénotype établies pour le criblage basé sur le phénotype ou sur une cible moléculaire connue. En effet, les hiPSC de patients permettent d'obtenir des modèles pour le drug screening portante les mutations d'intérêt ou exprimant un phénotype spécifique à une pathologie. Ces deux technologies ainsi associées permettent alors l'identification de molécules capables de restaurer une fonction ou

un phénotype dans des modèles pathologiques de maladies génétiques.

Il est possible de cribler des banques pour trouver de nouvelles molécules à potentiel thérapeutique mais également des molécules dites reposiotionnable et dont la structure est déjà connue. Lorsque la cible ou la voie de signalisation impliquée dans la pathologie est connue, il est alors possible de cribler des banques de molécules dont la fonction et la cible sont connues, comme c'est le cas pour la banque utilisée dans les travaux présentés dans cette thèse et présentée dans le Matériel et Méthodes. Le criblage à haut débit offre ainsi la possibilité de développer des approches de traitement plus personnalisées. De plus le repositionnement est une approche intéressante pour le cas des maladies rares pour lesquelles il existe peut, voire pas de traitement mais également pour les patients en « impasse » thérapeutique pour lesquels le traitement classique est inefficace. Le criblage de molécules repositionnables permet en cas de passage vers une utilisation en clinique de la molécule sélectionnée, de réduire les coûts et le temps de développement du nouveau candidat médicament car les profils de sécurité de biodisponibilité de la molécule sont déjà connus (Benchoua et al., 2021).

Dans le cadre des pathologies neurologiques rares ou neurodégénératives, des pathologies multifactorielles dont les mécanismes ne sont pas encore tous bien connus, le criblage à haut débit associé au CSPh offre la possibilité de créer des modèles de cellules neurales ou des neurones ayant un profil spécifique d'un patient. Le HTS offre alors la possibilité de découvrir de nouvelles approches pharmacologiques mais également, via l'étude des mécanismes d'action des molécules identifiées, d'explorer les mécanismes physiopathologiques à l'origine de ces maladies rares (Benchoua et al., 2021).

Enfin, le criblage à haut débit peut également être utilisé pour identifier des composés capables d'optimiser des protocoles de différenciation en cellules d'intérêt à partir de cellules souches, en comparant l'effet de plusieurs molécules sur la différenciation des CSP en cellules d'intérêt.

Une revue, Benchoua et al., 2021, sur la contribution des modèles dérivés de CSPh pour le drug sceening dans le cadre de pathologies neuronales a été publiée pendant la thèse. Elle est incluse à la fin de ce Chapitre.

5. Modélisation des nDA à partir de CSPh

Ces dernières décennies, l'intérêt pour les CSPh a connu un effet grandissant en recherche biomédicale. En effet grâce à leur capacité de pluripotence, une expansion rapide du développement de protocoles permettant de générer des neurones dopaminergiques est apparue. Les nDA sont d'ailleurs les neurones les plus différenciés à partir de CSPh (Marton & Ioannidis, 2019). Ces protocoles ont été principalement développés dans le cadre de la recherche de thérapie cellulaire de remplacement dans la maladie de Parkinson caractérisée par la perte des nDA de la SNpc. La recherche clinique sur la greffe dans le cadre de cette pathologie a débuté par des greffes allogéniques de progéniteurs des nDA mésencéphaliques issus de tissus fœtaux dans le striatum de patients atteints montrant que ces cellules étaient capables de s'intégrer et que certains symptômes de la pathologie étaient améliorés chez ces patients avec des effets cliniques variables (Arenas et al., 2015; Freed et al., 1992; Lindvall et al., 1990; Parmar et al., 2020; Peschanski et al., 1994; Spencer et al., 1992). Depuis les CPSh ont permis de fournir une autre option pour l'obtention des progéniteurs des nDA du mésencéphale (Figure 20). Plusieurs équipes ont développé des protocoles en ce sens.

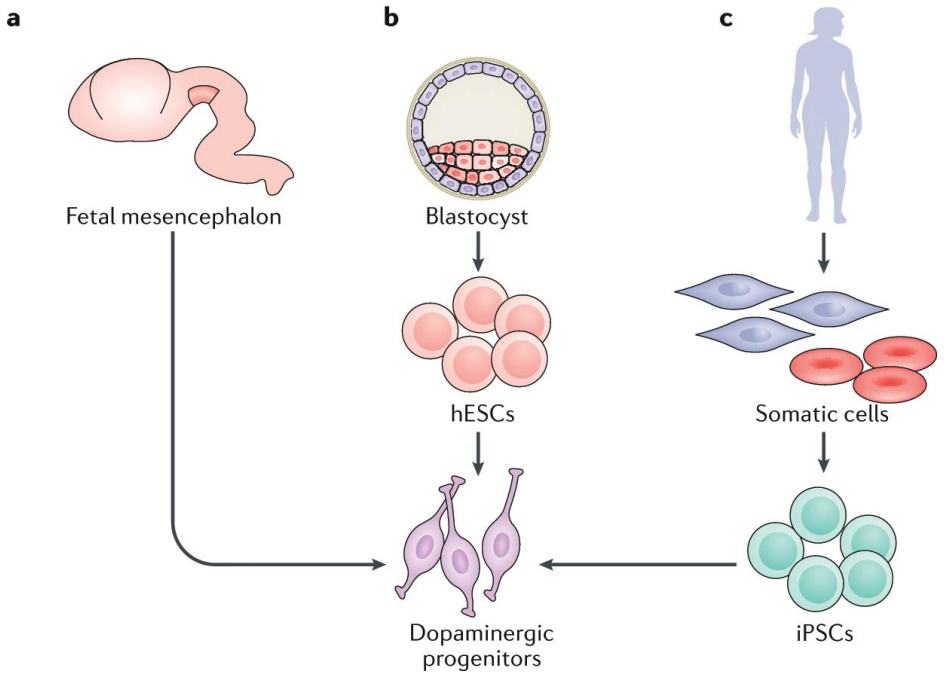


Figure 20 : Sources de thérapies de remplacement cellulaire testées pour la maladie de

Parkinson.

(a) La première source testée était les progéniteurs des nDA prélevés de tissus de MV fœtaux. (b) et (c) : avec la technologie des CSPh il est possible de dériver des progéniteurs des nDA du MV. (Source : Parmar et al., 2020).

Les principaux protocoles de différenciation sont résumés ou cités dans les travaux de revues suivant : Arenas et al., 2015; Marton & Ioannidis, 2019. Ces protocoles ce sont avérés efficaces pour produire des progéniteurs des nDA compétents pour s'intégrer chez des modèles animaux de la maladie de Parkinson puisqu'il a pu être observé une amélioration des symptômes moteurs chez ces modèles animaux (Adler et al., 2019; Grealish et al., 2014; Kikuchi et al., 2017; Kriks et al., 2011; Nolbrant et al., 2017; Steinbeck et al., 2015). Afin de caractériser l'identité des progéniteurs et des neurones dérivés, on utilise les marqueurs des progéniteurs du MV et des nDA comme *Lmx1a, FOXA2, EN-1, SHH, OTX2 TH, Tuj1* (Kirkeby et al., 2012; Kriks et al., 2011; Nolbrant et al., 2017). Les pourcentages et le rendement en progéniteurs dopaminergiques du MV et des nDA varient en fonction du protocole (Arenas et al., 2015). Il existe une certaine hétérogénéité entre les protocoles, en terme de rendement et de caractérisation des progéniteurs d'origine des nDA différenciés (Arenas et al., 2015; Marton & Ioannidis, 2019). Les principales motivations de développement de ces protocoles sont : l'efficacité, pouvoir fournir le plus de cellules dopaminergiques possible, la reproductibilité en définissant des conditions de production GMP* bien définies et l'optimisation pour le transfert au grade clinique à des fins de thérapie cellulaire (Barker et al., 2017; Marton & Ioannidis, 2019; Nolbrant et al., 2017; J. Takahashi, 2017).

Les protocoles de dérivation des progéniteurs dopaminergiques du MV et de différenciation des nDA sont basés sur les étapes principales de leur développement embryonnaire. La majorité d'entre eux s'attache à mimer les conditions de différenciation observées dans les modèles animaux *in vivo* (Arenas et al., 2015). Pour cela ils contiennent dans leur composition des morphogènes solubles et des facteurs de croissance qui, en fonction de leur concentration et de leur temps d'exposition, vont permettre d'induire une identité dopaminergique du MV à partir de CSPh. Ils vont imiter principalement les quatre grandes voies qui permettent la régionalisation et la spécification du domaine dopaminergique du MV : BMP/SMAD, SHH, WNT et Fgf8 (Figure 21) (Brodski et al., 2019).

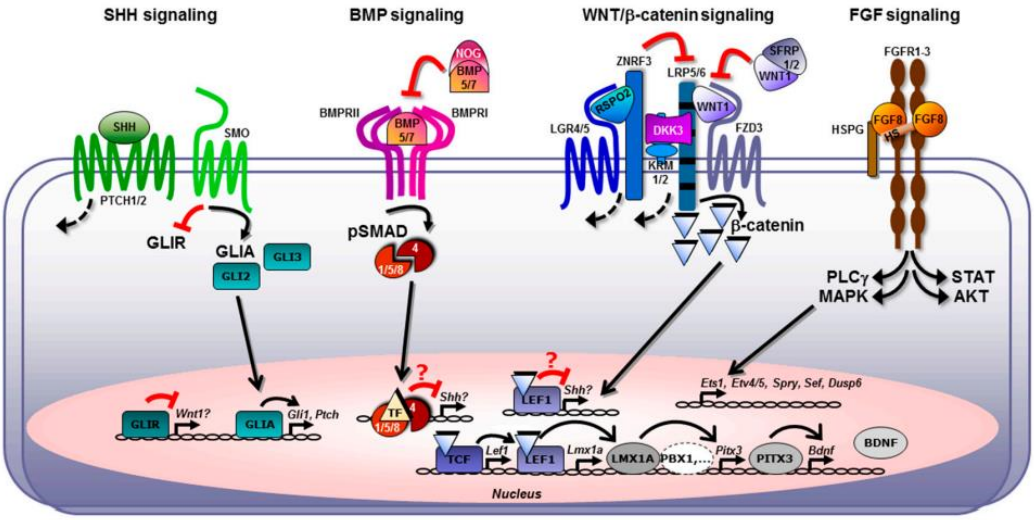


Figure 21 : Schéma des quatre principales voies de signalisation impliquées dans le développement des nDA.

(Source : Brodski et al., 2019).

Cependant, ces facteurs n'étant pas totalement spécifiques ils vont conduire à l'obtention d'autres populations en plus de celle des progéniteurs des nDA du MV. Pour la première étape qui consiste en l'induction du destin neural chez les CSPh, il a été montré par Chambers et al., 2009 qu'une double inhibition synergique de la voie des BMP/SMAD avec des cytokines telles que Noggin et la molécule SB431542 permettrait une induction neurale rapide et presque complète des CSPh (Chambers et al., 2009). En parallèle, l'ajout de SHH et d'une molécule activant la voie WNT (inhibiteur de la GSK-3β) permet le « positionnement » dorso-ventral et rostro-caudal correct respectivement afin d'obtenir des progéniteurs avec une identité du MV (Brodski et al., 2019; Kirkeby et al., 2012). L'ajout du Fgf8 dans un second temps permet de spécifier l'identité des progéniteurs dopaminergiques du MV (Doi et al., 2014; Kirkeby et al., 2012; Kriks et al., 2011), d'autant plus s'il est ajouté sur du long terme. Enfin, l'ajout du DAPT, un inhibiteur de la voie NOTCH permet d'induire la différenciation des neurones (Arenas et al., 2015). La figure suivante (Figure 22) montre les principaux protocoles de différenciation des CSPh en progéniteurs et nDA.

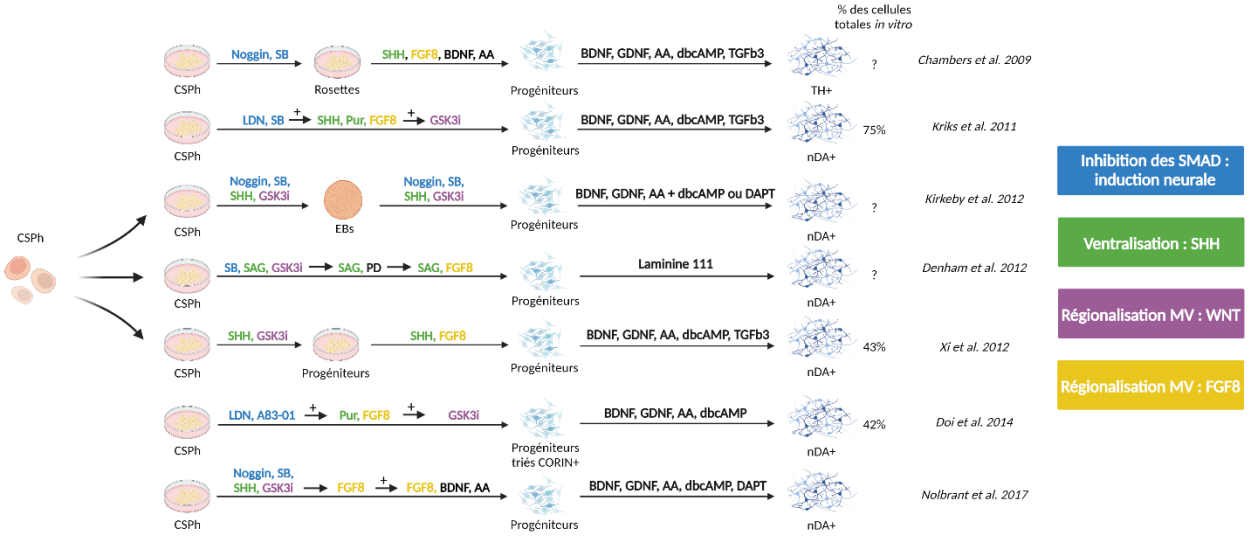


Figure 22 : Schéma représentant les principaux protocoles de différenciation des CSPh en progéniteurs des nDA et nDA ainsi que les voies sur lesquelles vont agir les cytokines.

(Source : Adapté de Arenas et al., 2015).

Revue bibliographique

Au cours de ma thèse j'ai pu contribuer à un travail de Revue bibliographique portant sur la contribution des modèles dérivés de cellules souches pluripotentes humaines aux travaux de recherche de nouvelles thérapies médicamenteuses pour traiter les pathologies neurologiques.

Le travail bibliographique effectué pour cette revue rentre dans la cadre de mon projet de thèse, celui-ci portant sur l'utilisation des cellules souches pluripotentes humaines dans la mise en place d'un test de criblage à haut débit. Le protocole utilisé permet de modéliser le développement des progéniteurs des neurones dopaminergiques dans le but d'identifier des composés permettant de moduler la genèse de ces progéniteurs dans un contexte physiologique (optimisation du protocole) et pathologique (maladie neurodéveloppementale).

"Contribution of Human Pluripotent Stem Cell-Based Models to Drug Discovery for Neurological Disorders"

Alexandra Benchoua[1, 2, *], Marie Lasbareilles[1, 3], et Johana Tournois[2]

[1]Neuroplasticity and Therapeutics, CECS, I-STEM, AFM, 91100 Corbeil-Essonnes, France

[2]High Throughput Screening Platform, CECS, I-STEM, AFM, 91100 Corbeil-Essonnes, France

[3]UEVE UMR 861, I-STEM, AFM, 91100 Corbeil-Essonnes, France

Cette revue a été publiée le 24 novembre 2021 dans *Cells* **2021**, 10, 3290.

DOI : 10.3390/cells10123290.

cells

MDPI

Review

Contribution of Human Pluripotent Stem Cell-Based Models to Drug Discovery for Neurological Disorders

Alexandra Benchoua [1,2,*], Marie Lasbareilles [1,3] and Johana Tournois [2]

[1] Neuroplasticity and Therapeutics, CECS, I-STEM, AFM, 91100 Corbeil-Essonnes, France; mlasbareilles@istem.fr
[2] High Throughput Screening Platform, CECS, I-STEM, AFM, 91100 Corbeil-Essonnes, France; jtournois@istem.fr
[3] UEVE UMR 861, I-STEM, AFM, 91100 Corbeil-Essonnes, France
* Correspondence: abenchoua@istem.fr

Abstract: One of the major obstacles to the identification of therapeutic interventions for central nervous system disorders has been the difficulty in studying the step-by-step progression of diseases in neuronal networks that are amenable to drug screening. Recent advances in the field of human pluripotent stem cell (PSC) biology offers the capability to create patient-specific human neurons with defined clinical profiles using reprogramming technology, which provides unprecedented opportunities for both the investigation of pathogenic mechanisms of brain disorders and the discovery of novel therapeutic strategies via drug screening. Many examples not only of the creation of human pluripotent stem cells as models of monogenic neurological disorders, but also of more challenging cases of complex multifactorial disorders now exist. Here, we review the state-of-the art brain cell types obtainable from PSCs and amenable to compound-screening formats. We then provide examples illustrating how these models contribute to the definition of new molecular or functional targets for drug discovery and to the design of novel pharmacological approaches for rare genetic disorders, as well as frequent neurodegenerative diseases and psychiatric disorders.

Keywords: pluripotent stem cells; high-throughput screening; drug discovery; precision medicine; neurodegenerative diseases; psychiatric diseases; rare diseases; neurons; glia

check for updates

Citation: Benchoua, A.; Lasbareilles, M.; Tournois, J. Contribution of Human Pluripotent Stem Cell-Based Models to Drug Discovery for Neurological Disorders. *Cells* **2021**, *10*, 3290. https://doi.org/10.3390/cells10123290

Academic Editor: Jason Ear

Received: 28 October 2021
Accepted: 23 November 2021
Published: 24 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Neurological disorders, such as neurodegenerative diseases and psychiatric disorders, are significant healthcare concerns since they trigger severe impairments in quality of life and have a large world prevalence [1]. The causes behind these diseases are multifactorial and not well understood. Neurological disorders are chronic with devastating consequences that can continue for years after diagnosis. Many insurmountable ethical and practical obstacles exist to conduct research on human subjects and primary brain samples, so experiments and conclusions have mainly relied on animal models both in vitro and in vivo. However, differences in physiology, genetics and developmental patterns between human and animal brains have led to discordance between preclinical drug studies and clinical trials [2–7]. Implementing relevant yet flexible human cellular models would help conducting drug discovery and hopefully decrease this high clinical failure rate.

Human pluripotent stem cells (PSCs), with their ability to self-renew and then differentiate into different types of brain cells, represent such an opportunity [7]. In 1998, Thomson et al. published, for the first time, a methodology for isolating and culturing human ESCs from blastocysts [8]. These embryonic stem cells (ESCs), which need to be harvested from human embryos, represented a valuable but very limited resource for human disease models. In 2007, Shinya Yamanaka's team showed that PSCs could be reprogrammed from a small sample of skin fibroblasts by expressing, combined, the four pluripotency-associated transcription factors SOX2, OCT4, KLF4and c-Myc. To differentiate

them from genuine PSCs derived from embryos, he named them induced pluripotent stem cells (iPSCs, [9]). Since then, more studies have described the successful reprogramming of iPSCs from different somatic cell types such as blood monocytes and epithelial urine cells [10–13]. Although there may be some methylation profile differences between iPSCs and ESCs due to the reprogramming process, they are considered equivalent regarding cell morphology, proliferation and differentiation capacity [14,15]. Importantly, iPSCs can be derived from patients who have neurological disorders, allowing researchers to study nervous system diseases within an endogenous human genetic background. The development of PSC-based technologies offers unique possibilities to investigate disease progression and perform drug discovery studies.

2. Integration of PSC-Derived Models in The Process of Drug Discovery

2.1. Strategies for Drug Discovery

Historically, therapeutic compounds were discovered by identifying the active ingredient in traditional remedies and testing those with given drug activity against pre-identified biological targets that were hypothesized to be disease modifiers, using the so-called candidate drug-based strategy. Progress in molecular biology and lab automation has progressively led to more systematic and agnostic approaches, including compound library screening, which consists of testing collections of thousands of small synthetic molecules or natural compounds with a cellular model. Cell-based drug screenings can be conducted at a single molecular target level, at a pathway level or at a phenotypic level [16,17]. Molecular target-based screening, was, until recently, the prevalent model used. In this approach, molecular targets are identified by basic research studies on disease models. The targets are generally gene products such as mRNAs or proteins that are abnormally expressed in a pathological context and are demonstrated to influence disease emergence or progression. Such molecular-based target screenings are usually developed in the context of monogenic diseases, in which the function of only one gene product is involved and possibly corrected, or if familial forms of more complex diseases exist and there is clear target identification [18–20]. Robust biochemical assays are then developed in order to identify hit compounds among large libraries using high-throughput screening techniques (HTS). An alternative approach consists of identifying pathways or molecular signatures rather than single-gene products that can be targeted by compounds [21]. The use of omic techniques, such as transcriptomics, proteomics and metabolomics, can be integrated to identified pathways that are associated with pathogenesis [22–26]. The epigenetic dimension can also be investigated in complex, non-Mendelian disorders by unbiased techniques to identify novel pathways that can serve as biological targets for HTS [27,28]. Interestingly, these pathways can be common to several diseases [29–31]. Finally, a phenotypic-based approach can be applied. Compounds are screened for their ability to normalize functional or phenotypic parameters in disease-relevant models, such as axonal transport, growth processes, synaptic functions or neurodegeneration. Compared with molecular and pathway approaches, functional screening represents a higher level of complexity; however, this integrated and agnostic strategy is also more promising for disorders of unknown, complex or multigenic origin. In phenotypic cell-based screenings, the assay is performed on a support that is suitable for image-based high-content screening (HCS) to identify positive hits [32–34].

Overall, the process of de novo drug discovery screening of new chemical entities (NCE), from the initial HTS or HCS to the final marketing of a compound, requires 10–17 years. To limit cost and decrease time, one possible strategy is to use specific chemical libraries that are smaller, but enriched with high drug-likeness compounds [35]. These compounds have already been tested for their safety and bioavailability and most correspond to drugs that are commercially available for human use. Positive hits represent candidates for drug-repositioning approaches or starting points for the discovery of new drugs, based on their known structure and mechanisms of action [36–38]. Compared to de novo drug discovery, drug repositioning allows the timeline for marketing a given

compound to be shortened to 3–5 years. Drug repositioning is particularly attractive for rare genetic diseases [39,40] and for the identification of new molecules for subgroups of patients who do not respond to gold standard treatments or suffer many unwanted side effects that force treatment withdrawal.

2.2. Pluripotent Stem Cells as Biological Material

While extremely powerful, cell-based high-throughput screening (HTS) requires a large quantity of cells relevant to the disease that can be produced repeatedly, robustly and homogeneously. Ideally, these cells can be frozen to constitute large banks, in order to allow sequential runs of screenings to be performed and selected compounds to be further validated and characterized. Differentiated cells obtained from patient-derived PSCs offer both flexibility and relevancy for model disorders that affect brain development and functioning. Indeed, it is possible to obtain large quantities of cells without genetically modifying them with oncogenes thank to their self-renewal ability. Then, it is possible to differentiate PSCs into a variety of neuronal subtypes as well as glial cells. Protocols of differentiation are based on the recapitulation of human neural development in vitro (Figure 1). PSCs are exposed to developmental cues to guide them progressively along the steps necessary to specify a particular brain cell type. The first step consists of restricting the potency of the cells to the neural lineage to obtain neuro-epithelial structures resembling the embryonic neural tube. One of the most widely used and simple technique is the so-called dual SMAD inhibition, in which inhibitors of BMP and TGF-beta pathways are used to convert homogeneously PSCs into neuro-epithelial structures, named rosettes. The simple inhibition of these two pathways was demonstrated to be sufficient to release the cells from pluripotency while blocking their engagement in alternative fates [41,42]. Regional specification of the neuro-epithelial structures is obtained in a second effort by using patterning factors or morphogens. Dorso-ventral patterning is conditioned by the gradual and antagonistic role of BMPs and SHHs, while rostro-caudal positioning is under the control of the Wnt/beta catenin and FGF8 pathways [43,44]. The population of regionally restricted neural progenitors can be further amplified and frozen or terminally differentiated into post-mitotic neurons expressing brain region-specific markers and corresponding neurotransmitters identities [45].

This strategy was successfully applied to differentiate PSCs into a variety of neuronal subtypes relevant to neurodegenerative and neuropsychiatric diseases [46,47], such as hippocampus CA3 pyramidal neurons, which exhibit the electrophysiological properties of mossy fibers of the dendate gyrus [48]; hypothalamic-like neurons capable of secreting orexigenic and anorexigenic neuropeptides and responding appropriately to the metabolic hormones ghrelin and leptin [49]; GABAergic interneurons of the cortex and the basal ganglia [50,51]; serotoninergic neurons of the raphe nuclei [52,53]; dopaminergic neurons of the substantia nigra [44,54]; cortical pyramidal neurons [55–57]; and spinal motoneurons secreting acetylcholine [58,59]. Glial cells can also be derived from PSCs, including astrocytes [60–64], oligodendrocytes [65–68] and microglia [69–72], allowing the co-culture and recapitulation of cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms leading to disease progression to be conducted [73–82]. Next to these "growth-factor"-mediated protocols, several groups have described methods of direct conversion of PSC into subtypes of neurons using forced expression of transcription factors. These protocols by-pass essential steps of neural differentiation and have the advantage to reduce the time of differentiation and homogenize neuronal production. Forced expression of NEUROG2 promotes the conversion of PSC into excitatory glutamatergic neurons [83]; ASCL1 and DLX2, with or without LHX6, into GABAergic neurons [84,85]; ASCL1, with NURR1 and LMX1A, into dopaminergic neurons [86]; and NEUROG2, with ISL1 and LHX3, into motoneurons [87]. Considerable efforts have also been made to standardize cultures of PSC-derived brain cells into miniaturized formats, such as 384-well plates, allowing a systematic analysis of pathological phenotypes and compound testing at large throughput to be performed [56,88–98].

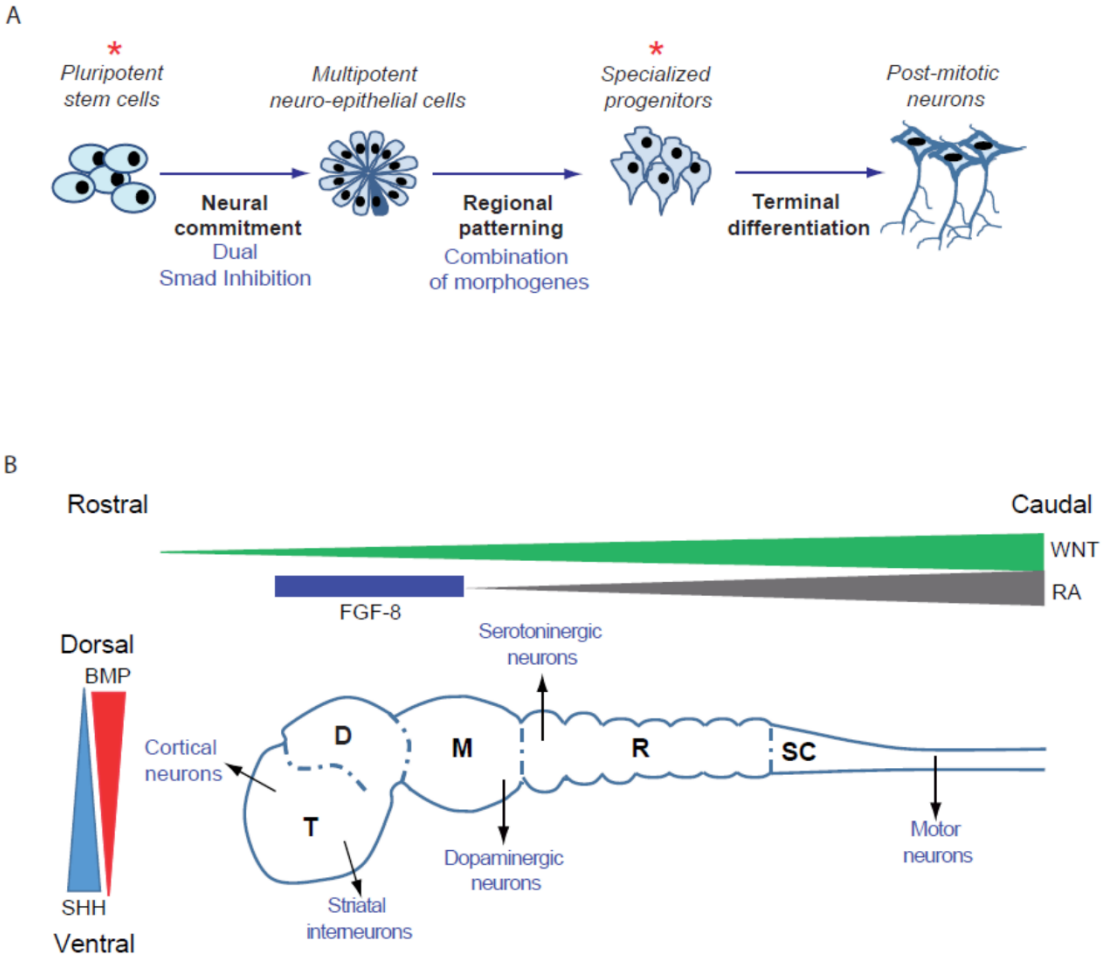


Figure 1. Specification of different types of neurons starting from pluripotent stem cells. (**A**) Steps leading from PSCs to terminally differentiated neurons. Stars indicate the self-renewing cell types that can be amplified and frozen to create large cryopreserved banks of biological materials. (**B**) Schematic representation of the human fetal brain with the 5 different regions, example of the type of neurons that emerge from these regions and the main morphogens involved in patterning. T, telencephalon; D, diencephalon; M, midbrain; R, rhombencephalon; SC, spinal cord; BMP, Bone Morphogenetic Factor; FGF-8, Fibroblast Growth Factor-8; RA, retinoic acid; SHH, Sonic Hedgehog.

In summary, compared to other models previously used for neurological disorder-related drug discovery, PSC-derived models combine the relevancy of human primary neural cells and the flexibility of a cell line. Progenitors can be expended until reaching the cellular mass necessary to perform target identification and to conduct high-throughput screening of compounds. Once differentiated, patient-derived cells possess the molecular, electrophysiological and morphological particularities of post-mitotic neurons of the patient, offering the possibility to study the influence of their genetic background on the expression of the disease and the differential response to drugs. In the last decade, PSC-neural cells derived from patients affected by rare genetic diseases have paved the way for disease modelling and drug discovery, mainly by examining the repositioning of existing therapeutic compounds. Collections of iPSCs reprogrammed from individuals with more frequent disorders are now available and offer an unpreceded substrate to better understand more complex diseases, stratify patients, develop new early pharmacological interventions and adopt precision medicine approaches (Figure 2).

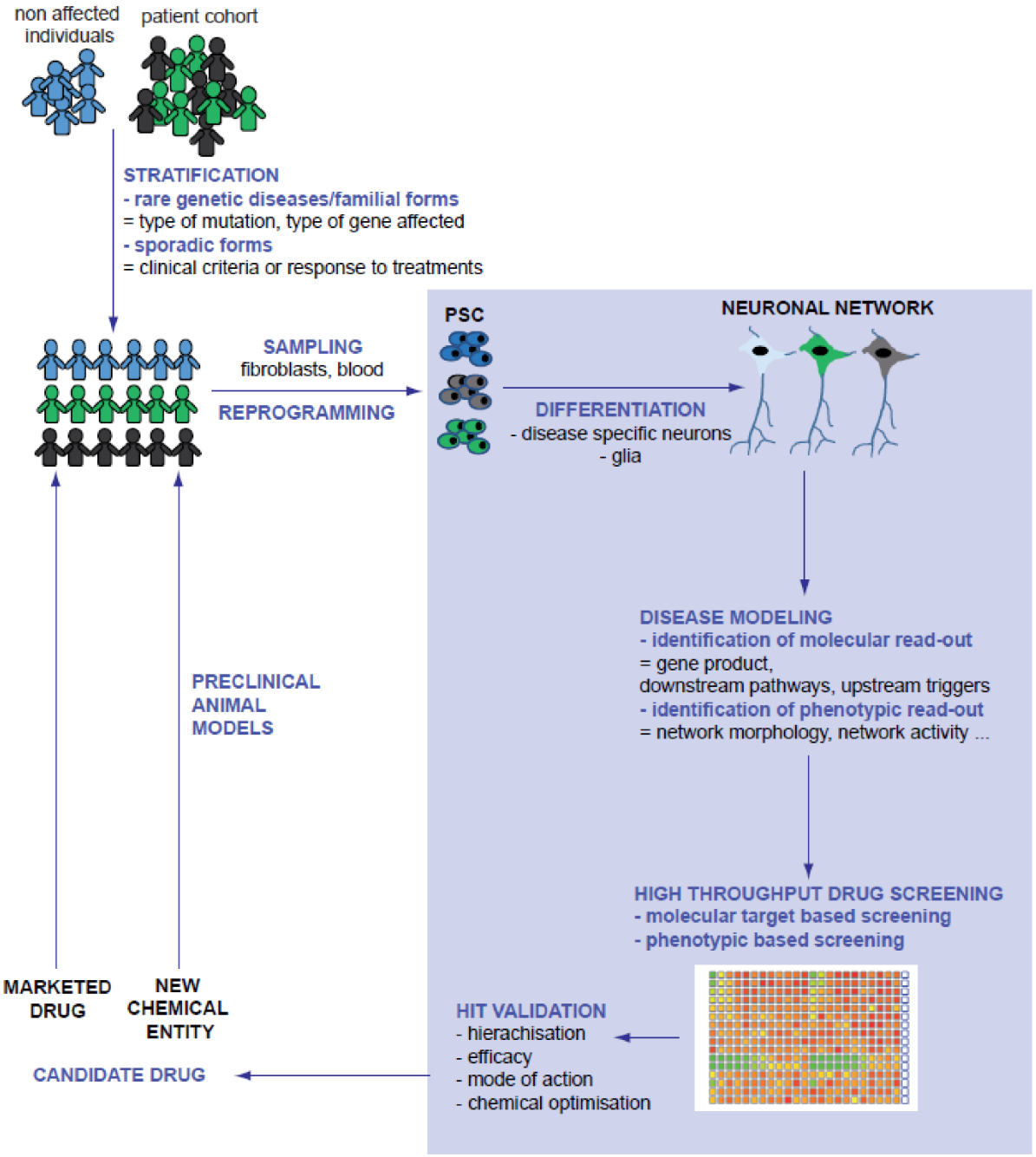


Figure 2. Integration of PSC-derived models in the process of drug discovery. Grey font highlights the part of disease modelling, drug discovery and compound optimization performed on PSC-derived cells.

3. Paving the Way: Rare Genetic Diseases

Rare diseases are conditions that affect a small proportion of the population (fewer than 200,000 persons in the USA or fewer than one in 2000 in Europe). The Orphanet portal for rare diseases and orphan drugs (http://www.orpha.net, accessed on 15 September 2021) currently lists more than 5800 rare diseases. Many are genetically inherited and the genetic causes are clearly identified [99]. From the beginning of the human PSC history, rare genetic disorders have been attractive models for proof-of-concept studies of disease modelling. hESC derived from embryos after pre-implantation genetic diagnosis were a first source of PSCs with natural, disease-inducing mutations. iPSCs now represent an opportunity to create collections of cells from cohorts of patients with clear genotype–phenotype correlations. Since only one gene product is involved, it is also a straight-forward strategy

to correct or induce mutations by genetic engineering for in vitro validation, in a given cell type, of the genotype-phenotype correlation. Accordingly, the first "pharmacological" studies using PSC-derived neurons were aimed at demonstrating that several genetic diseases hallmarks were recapitulated successfully in hESCs or iPSC-derived neurons and that they could serve to validate candidate drugs at low throughput [100–103]. PSCs from patients with rare genetic diseases were then the first to be used as proof of concept that PSC-derived cells can serve as support to develop innovative compound identification strategies using HTS. In monogenic diseases, only one gene product acts as the relevant disease-modifier, implying a very clear path to the development of a screening assay with only one molecular target to focus on. Accordingly, most screening conducted relied on molecular target-based approaches and used libraries containing known bioactive compounds, in order to identify lead compounds or new therapeutic targets or approved drugs for direct repurposing. Several HTS experiments were successfully conducted using PSCs from patients with neurological disorders. All of these studies illustrate the invaluable advantage of working with cell types relevant to the disease.

3.1. Fragile-X Syndrome (FXS)

The first advantage is to be able to explore genes and pathways expressed at physiological levels without the need to introduce exogenous gene expression systems. This was exemplified in studies that screened compounds for genetic forms of ASD induced by the loss of function of FRMP [104–106] and duplication of a segment of chromosome 7 [107]. FXS was the first neurodevelopmental disorder to be modeled with this aim using iPSCs. FXS is a neurodevelopmental disorder characterized by mild-to-severe intellectual disability and abnormal behaviors, such as attention deficit, anxiety and depression [108]. FXS is also the most common known monogenic cause of autism, with 43–67% of male patients meeting the criteria of autism spectrum disorders. At the genetic level, FXS is linked to mutations (triplet repeats) in the 5′-untranslated region of the fragile X mental retardation 1 (FMR1) gene, which results in the absence of the FMRP protein. FMRP is a brain-specific RNA-binding protein that regulates the transport and translation of many mRNAs that play an important role in learning and memory [109]. Consequently, screenings were conducted in neural progenitors to identify compounds that could increase FRMP levels. Kaufmann and collaborators used FXS-patient iPSCs to develop an image-based HTS assay measuring the levels of FRMP in neural stem cells using immunofluorescence [104]. In all, 50,000 compounds were screened, including epigenetic regulators with known mode of action (7%), molecules covering a broad chemical space and biological diversity (46%) and a set of randomly selected compounds from an internal archive (47%). Four hits were identified and further confirmed for efficacy and absence of toxicity in dose-response experiments but were not further investigated for their mode of action or evaluated in an animal model. At the same time, Kumari and collaborators described the screening of 5000 known tool compounds and approved drugs in neural stem cells differentiated from an FXS patient-derived iPSC line using time-resolved fluorescence resonance energy transfer assay for FMRP detection [105]. Interestingly, the primary screening was performed in a 1536-well plate format, a format rarely used for cell-based assays and six compounds were identified that modestly increased FMR1 gene expression in FXS patient cells. Although none of these studies resulted in clinically relevant compounds, they provide strong proof of principle of the assays performed on patient-derived neural stem cells in a very high-throughput format to identify new lead compounds for FXS drug development. More recently, Li and collaborator used the newly described CRISPR/Cas9 system to create a reporter line for detecting FMR1 gene reactivation in human neural cells and used it to screen 1262 bioactive compounds [106]. This revealed two epigenetic regulators, 5-aza-dC and 5-aza-C, that significantly restored FRMP levels in disease cells. This study demonstrated that CRISPR/Cas9 can successfully be combined with iPSC-derived neural cells to design customized screening lines by knocking the luciferase reporter into endogenous target genes in order to obtain reporter lines and to reduce screening costs while increasing

screening performance. This was possible only because iPSC-derived neural stem cells physiologically express endogenous levels of FRMP and proved the value of screening in human cells differentiated from PSCs. Together, these three studies demonstrate the feasibility and relevance of HTS in the neural progeny of PSCs for neurodevelopmental disorders.

3.2. Duplication of a Segment of Chromosome 7 (7Dup)

Validation that screenings can successfully be conducted for larger genetic aneuploidies was then reported. Duplication of a segment of chromosome 7 at 7q11 comprising 26–28 genes is one of the best-characterized copy number variations (CNVs) underlying autism. 7Dup patients show a range of autism spectrum disorder traits, especially varying degrees of language impairments and social restrictions [110]. Among the genes of the 7q11.23 region, general transcription factor II-I (GTF2I) has key relevance. This gene mediates signal-dependent transcription and plays a prominent role in various signaling pathways [111]. Most importantly, convergent evidences have implicated GTF2I as a major mediator of the cognitive–behavioral alterations in 7Dup [112]. Interestingly, deletion of this gene is also related to another rare disease, the Williams–Beuren syndrome. Cavallo and collaborators screened, using RT-PCR, 1478 compounds for their potential to increase GTF2I mRNA levels in 7Dup iPSC-derived cortical glutamatergic neurons. Some HDAC inhibitors were selected and further validated by quantifying the modulation of genes included in the segment duplication and involved in the Williams–Beuren syndrome [107].

3.3. Metabolic Disorders

Neurodegeneration is another aspect that requires authentic neurons to develop predictive models for drug screening, since these post-mitotic cells are more sensitive to metabolic stressors than peripheral cells. This was illustrated by studies of GM1 gangliosidosis and Lesch–Nyhan disease [113,114]. GM1 gangliosidosis is a lysosomal storage disorder characterized by abnormal accumulation of GM1 ganglioside. The main clinical feature of the disease is neural dysfunction due to massive GM1 ganglioside deposition in the central nervous system [115]. This abnormal deposition is caused by a deficiency in lysosomal β-galactosidase (β-GAL) activity which limits the body's ability to degrade GM1 ganglioside in lysosomes leading to excessive GM1 ganglioside accumulation and eventual impairment of several pathways, including the unfolded protein response (UPR), endoplasmic reticulum calcium signaling and autophagy. Altogether, this induces progressive neurodegeneration. Kajihara and collaborators generated induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from patients with GM1 gangliosidosis, differentiated neurons and developed an image-based HTS assay to detect GM1 ganglioside accumulation. A collection of 2217 compounds containing already approved drugs and major chemicals used in pathway analyses was screened. The two best compounds, amodiaquine and thiethylperazine, were then shown to restore the presynaptic deficit in disease-derived neurons, upregulate the enzymes responsible for lysosomal glycosphingolipid degradation and activate autophagy. Interestingly, the authors also validated the hit compounds in a mouse model of GM1 gangliosidosis, demonstrating efficacy in reducing ganglioside accumulation in the brain and protecting it from degeneration [113].

LND is caused by deficiency of the purine salvage pathway enzyme hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT), an X chromosome-encoded protein [116]. LND is characterized by severe neuropsychiatric disorders, which present with choreoathetosis, dystonia, aggression and self-injurious behavior [117]. Mutations in the HPRT1 gene, which code for HGPRT, are different for each individual but patients exhibiting the most severe neurological symptoms consistently have mutations that totally block protein synthesis [118]. To optimize the chance that a compound is efficient for most children with LND, independent of the type of mutation affecting HPRT1 gene, one strategy is to identify the compounds that activate alternative metabolic pathways that compensate for the deficiency of purine salvage in a target-agnostic manner. From a metabolic point of

view, neural stem cells and neurons mainly rely upon recycling as a source of purine, while most other somatic cells rely, instead, upon de novo synthesis, a specificity that renders the brain more vulnerable to HGPRT deficiency than other organs [119]. In this context, the use of authentic human neural stem cells and neurons rather than peripheral cells such as fibroblast or blood cells was instrumental. Ruillier and collaborator decided to conduct a functional screening in neural stem cells and neurons derived from iPSCs of children affected with LND treated with azaserine, an inhibitor of the synthesis of purine de novo, in order to selectively induce cell death in HGPRT-deficient cells [114]. More than 3000 molecules were screened for their ability to rescue HGPRT-deficient cells from azaserine toxicity. Six pharmacological compounds were identified, all possessing an adenosine moiety, that corrected HGPRT deficiency-associated neuronal phenotypes by promoting metabolic compensations in an HGPRT-independent manner. Among these compounds, S-adenosylmethionine was reported in several case studies to ease the neuropsychiatric symptoms in LND [120–124], demonstrating the relevance of the screening strategy.

3.4. Cyclin-Dependent Kinase-Like 5 (CDKL5) Deficiency

Working with authentic and neuronal networks offers the opportunity for phenotypic and functional screening. This is of particular interest for diseases that involve abnormal excitability such as epilepsy. This was exemplified in a study by Negraes and collaborators, who conducted a phenotypic and target agnostic assay monitoring spontaneous calcium activity in 3D neuronal cultures as a read-out for network electric activity, which is abnormally increased in CDK5L-deficient neurons [125]. CDKL5 gene encodes for a serine/threonine kinase highly expressed in the central nervous system. Mutations in this gene cause CDKL5 deficiency disorder (CDD), characterized by neurodevelopmental delay, motor dysfunction, autistic features and early-onset intractable seizures, a defining trait that led to the standalone classification of this pathology [126]. Patients iPSC-derived 3D cortical spheroids exhibited hyperexcitability as measured as spontaneous calcium oscillations allowing a collection of 1112 compounds modulating different neuronal signaling pathways to be screened. Ivabradine, solifenacin, AZD1080 and crenigacestat were shown to reverse the phenotypic abnormality and were further investigated for their ability to ameliorate other CDD cellular phenotypes, including outward radial cellular migration defects. Due to their ability to regulate abnormal epileptic electrical activity in human neurons, these compounds open new therapeutic opportunities for other types of pathologies that include intractable seizures regardless of the initial trigger.

3.5. Phelan–McDermid Syndrome (PMS)

One final advantage of modelling neurological disorders with authentic neurons obtained from patient-derived iPSC is the development of personalized medicine strategies. This was achieved in PMS [127]. This is the first study in which a compound identified by HTS in a patient-derived cell line was actually evaluated directly and repurposed in the same patient. PMS is a neurodevelopmental disorder characterized by global developmental delay, intellectual disability, severe speech delays, poor motor tone and function, and ASD [128]. Genetic screening of the genome region identifies SHANK3 as the main gene involved in the ASD features associated with PMS. De novo truncating mutations inducing haploinsufficiency of the SHANK3 gene were estimated to be present in 0.69–2.12% of individuals with ASD [129,130]. SHANK3 is an abundant component of the postsynaptic density, where it acts as a scaffolding protein recruiting key post-synaptic elements, such as glutamate receptors, and linking them to the actin cytoskeleton [131]. Neurons differentiated from iPSCs of individuals with SHANK3 haploinsufficiency exhibited impaired electrophysiological responses to glutamatergic synapses' stimulations, which could be corrected by re-introducing SHANK3 cDNA expression, validating their value for drug discovery [132]. In this study, iPSCs were derived from two children with PMS in order to constitute neuronal networks in a screening format (384-well plates). Patient-derived neurons exhibit reduced SHANK3 mRNA and protein expression, reduced neurite size,

decreased glutamatergic synapses and decreased spontaneous network activity. In all, 202 marketed drugs were tested on these neurons and two of them, lithium and valproic acid, were demonstrated to increase SHANK3 levels (mRNA and synaptic protein), rescue neurite length and synapse numbers and, at least partially, restore network activity. Lithium was consecutively administrated during one year to one of the two patients and clinical examination showed significant improvement in the child's social performance. This study demonstrated the feasibility of using patient derived-iPSC to select patient specific treatment, an approach described as personalized medicine.

Taken together, these studies using rare genetic disorders as models demonstrated that PSC-derived neural stem cell and neurons can be suitable biological materials to conduct compound screening at high throughput, can allow compounds that modulate endogenous targets that are not physiologically expressed in other cell models to be identified, are suitable for neurodevelopmental and neuropsychiatric diseases as well as neurodegenerative diseases and offer unique opportunities for phenotypic screening. This opens a path for research in prevalent multifactorial diseases and the promotion of precision medicine.

4. Neurodegenerative Diseases

Neurodegenerative diseases are among the leading causes of disability and a major cause of death worldwide. The first defining feature of these disorders is, of course, the death of neurons following a period of neuronal dysfunction and synaptic loss. The anatomical distribution of neurodegeneration determines the clinical pattern of individual disorders, which varies widely, but all of these disorders share progressive loss of cognitive and motor functions to varying degrees, which eventually leads to institutionalization and death. Pharmacotherapy is so far aiming at reducing clinical symptoms but does not stop disease progression. Misfolding, accumulation and aggregation of disease-specific proteins are universal features of neurodegenerative diseases that preceded the death of neurons by several years [133,134]. therefore, current investigations into therapeutic compounds are mainly focused on abnormal protein conformation and accumulation. However, PSC-based disease modelling additionally offers the possibility to follow disease progression and identify new molecular targets for earlier therapeutic interventions. They also offer the opportunity to develop strategies covering several disorders in a less specific manner. Examples of the contributions for the two most common neurodegenerative diseases, Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (PD), are provided.

4.1. Alzheimer's Disease

AD is the most common cause of elderly dementia. This neurodegenerative disease is clinically characterized by progressive and gradual cognitive impairment, synapse loss and substantial loss of neurons in later stages. Currently, there are only two approved clinical treatments for AD, acetyl-cholinesterase inhibitors and N-methyl-D-aspartate receptor antagonists, both with very limited therapeutic effects. Early-onset AD is linked to autosomal-dominant inherited mutations in the genes encoding amyloid precursor protein (APP), presenilin 1 (PSEN1) and presenilin 2 (PSEN2). These cases are referred to as familial Alzheimer's disease and are well characterized. In contrast, the etiology of 95% cases of late-onset AD, referred to as sporadic Alzheimer's disease, is not known and may involve various triggers, including genetic and environmental factors [135]. Neuropathological hallmarks of AD are the formation of extracellular amyloid plaques, composed of aggregated amyloid β peptides (Aβs) and neurofibrillary tangles, formed by hyperphosphorylated tau proteins [136,137]. Both have received a great deal of attention in an effort to develop new pharmacological strategies [138]. Modelling of familial early-onset AD demonstrated that neurons differentiated from patient-derived iPSCs successfully recapitulated characteristic AD phenotypes, including the formation of Aβ aggregates and neurofibrillary tangles, which can be reversed by candidate pharmacological treatments, confirming the value of the model in the search for new pharmacological approaches [139–143]. Aβ accumulation

and tau hyperphosphorylation were also reported using iPSCs derived from sporadic cases [144].

Aβ pathological peptides are produced by sequential cleavage of amyloid precursor protein (APP) by β-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) and γ-secretase. These two enzymes are currently the most investigated targets for disease-modifying drugs in AD. However, strong inhibition of γ-secretase and BACE1 widely perturbs the processing of numerous endogenous substrates important for physiological functions other than APP and causes serious side effects after long-term treatment. Phenotypic, target-agnostic screening of PSC-derived neurons could help to identify compounds with alternative modes of action, aimed at preventing Aβ accumulation and the resulting neuronal toxicity. Cell death induced by Aβ oligomers was one of the easiest read-outs to exploit for drug screening. Xu and collaborators screened a proprietary GSK library of several hundred compounds targeting kinase pathways using a luciferase-based method to quantify neuronal death induced in PSC-derived forebrain neurons by exposure to oligomers of β-amyloid 1-42 (Aβ1-42) proteins [145]. They identified 19 hits rescuing cell death and impaired neurite outgrowth deficits in this model. Mechanism of action studies demonstrated that the compounds targeted the CDK2 protein; therefore, this was proposed as a potent new target to protect neurons from Aβ toxicity in AD. The neuroprotective potential of CDK-2 targeting compounds was additionally confirmed in another HTS of 1000 compounds, spotting five hits acting as Cdk-2 modulators [146]. However, while successful, the screening cascades designed in these studies allowed the compounds blocking cell death downstream from Aβ aggregation to be identified, but they do not propose approaches aimed at identifying pathways that can be targeted to block early protein misfolding. Kondo and collaborators developed a high-throughput electrochemiluminescence assay to quantify the A42/A40 Aβ peptide ratio in neurons differentiated from iPSCs with PSEN1 G384A mutation [139]. They screened 1258 pharmaceutical compounds, acquired 27 primary Aβ-lowering hits, prioritized the hits by chemical structure-based clustering and selected six lead compounds. To maximize the anti-Aβ effect, they tested a synergistic combination of bromocriptine, cromolyn and topiramate as an anti-Aβ cocktail. The combination was evaluated in vitro in iPSC-derived neurons from 13 individuals, including familial and sporadic AD patients, confirming that the combination of anti-Aβ compounds could reduce Aβ aggregation in all participants. This study proposed the design of a new screening platform allowing researchers to systematically test compound libraries for efficacy against protein misfolding and aggregation in a mechanistic agnostic manner, which showed great potential for marketed drug repositioning, alone or in combination and to speed new chemical entity identification and development.

Lowering tau hyperphosphorylation is another attractive target for drug screening in AD. Several strategies have been proposed to evaluate a compound ability to reduce tau phosphorylation or, more globally, tau levels in neurons. Wang and collaborators [147] used iPSC-derived glutamatergic neurons combined with a high-content screening assay to identify tau-lowering compounds in the LOPAC library of bioactive compounds (>2000 compounds). They identified moxonidine and metaproterenol, two adrenergic receptor agonists, as a class of compounds with potential to reduce endogenous human tau levels and delay AD disease progression. Van der Kant and collaborators adopted a more specific approach by quantifying, using automated cell imaging, the level of pThr231Tau in neurons differentiated from iPSCs of patients with the familial form of AD consisting in the duplication of the APP gene [148]. A collection of 1684 approved and preclinical drugs was screened for their efficacy in lowering neuronal pThr231Tau using immunofluorescence to quantify the ratio of pThr231tau/total tau levels combined with cell viability. Four inhibitors of cholesterol synthesis, namely, atorvastatin, simvastatin, fluvastatin and rosuvastatin, showed the best activity on these read-outs. Mechanism of action studies pointed to 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) inhibition and sequential proteasome activation as the main pathways involved in a compound efficacy. Consequently, the investigators selected another compound to reduce cholesterol esterase activity

in cells, which was better tolerated by astrocytes and neurons. Efavirenz was tested using neurons derived from a cohort of patients with different forms of AD and demonstrated the same efficacy but better tolerability than the lead compound simvastatin. Altogether, this point to the cholesterol metabolism as a druggable axis regulating tau phosphorylation and, consequently, Aβ accumulation via activation of the proteasome. Together, these drug screening studies demonstrate new potential for marketed drugs in reducing Aβ toxicity in AD and point to CDK2 and HMGCR inhibition as new opportunities to develop more efficient treatments.

4.2. Parkinson's Disease

PD is another well-described neurodegenerative disorder which affects over 6 million people worldwide, predominantly over the age of 65 [149]. PD is characterized by motor symptoms, including rigidity, resting tremor, bradykinesia and postural instability, and non-motor features, including cognitive impairments, anxiety and depression [150]. The motor symptoms are due to the progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta, with approximately 50% of dopaminergic neurons lost in the midbrain at the onset of motor symptoms [151]. The majority of PD cases are idiopathic, with only about 10% attributed to heredity. Currently, pharmacologic treatments are aimed primarily at correcting dopamine insufficiency. However, an effective disease-modifying therapy has yet to be established. The pathological hallmarks of PD are the presence of intraneuronal cytoplasmic inclusions of α-synuclein (α-syn), named Lewy bodies, and dystrophic neurites that also contain α-syn deposits. The mechanisms leading to the formation and the pathogenic significance of these inclusions remain unknown. The reason why dopaminergic neurons are more prone to α-syn accumulation and vulnerable to its toxicity is not well understood, but PSCs offer a unique opportunity to model this phenomenon in a human genetic and epigenetic context. Several studies have reported the aggregation and toxicity of endogenous α-syn in neurons differentiated from PSCs of patients with familial forms of PD, which may be reversed by candidate drug approaches [152–154]. Increased levels of aggregated α-syn in PD suggest that defective protein handling and clearance contribute to its pathogenesis. Alpha-synuclein is degraded by both the ubiquitin-proteasome system and the autophagy/lysosomal pathway and they both represent attractive targets to modulate α-syn accumulation [155]. An analysis of dopaminergic neurons derived from patients with idiopathic and familial forms of PD identified that mitochondrial oxidative stress, leading to oxidized dopamine accumulation, resulted in reduced glucocerebrosidase enzymatic activity, lysosomal dysfunction and α-syn accumulation [156]. This toxic cascade was observed in human but not in mouse PD neurons and could be blocked by mitochondrial antioxidants and calcium modulators. This important link between mitochondrial and lysosomal/autophagy dysfunction in PD pathogenesis, revealed thanks to patient-derived PSCs, was the focus of the development of methods aimed at screening compound libraries for early intervention in PD [157]. In order to identify therapeutic agents to ameliorate mitochondrial clearance, Yamaguchi and collaborators used dopaminergic neurons obtained from patients with familial PD resulting from Parkin or PINK1 mutations [20]. The proposed system recapitulates the deficiency of mitochondrial clearance, ROS accumulation and increased apoptosis by treating of these neurons with carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone. Accordingly, the image-based high-content screening read-outs included the quantification of mitochondria size and area, reactive oxygen species production with ROS dyes and neuronal death monitored with caspase-3. In all, 320 pharmacologically active compounds were screened for their ability to ameliorate these parameters. Four hits, MRS1220, tranylcypromine, flunarizine and bromocriptine, were identified and further tested in idiopathic iPSC-derived neurons and *PINK1*-inactivated *Drosophila*. Bromocriptine was the most efficient compound. Interestingly, it was the second time that bromocriptine was identified by HTS on iPSC-derived neurons as a molecule lowering protein misfolding and aggregation, since it was one of the molecules proposed by Kondo as an anti- Aβ aggregation agent [158]. This demonstrates

that neurons derived from PSCs can help in identifying common targetable pathways in PD and AD.

4.3. Screenings for Compounds Targeting Several Diseases

Strategies for screening based on protein misfolding as a read-out have identified independently common compounds that show promise for different disorders, suggesting that less specific, phenotypic-based approaches may also lead to drugs with a larger spectrum of action. Neurotrophic factor administration has long been proposed as a therapeutic option for diseases in which the main component is cell death [159]. Brain-derived Neurotrophic factor (BDNF) was one of the most investigated trophic factors [160,161]. BDNF is synthetized and secreted by neurons upon release of transcription from the repressing factor REST. With REST being expressed endogenously by cortical progenitors and neurons differentiated from PSCs, this model was used to screen new chemical entities for their ability to promote REST inhibition and endogenous BDNF synthesis [162]. HTS of a library of 6984 new chemical structures using a luciferase assay measuring REST activity in neural derivatives of hESC led to the identification of two benzoimidazole-5-carboxamide derivatives. The most potent compound, X5050, was found to target REST degradation, but not REST expression, RNA splicing or binding to the RE1 sequence. Differential transcriptomic analysis revealed the upregulation of neuronal genes targeted by REST in wild-type neural cells treated with X5050. This activity was confirmed in neural cells produced from iPSCs derived from a patient with Huntington's disease. Acute intraventricular delivery of X5050 increased the expressions of BDNF and several other REST-regulated genes in the prefrontal cortex of mice with quinolinate-induced brain lesions. Altogether, this points to X5050 as a lead compound to be chemically optimized and evaluated in different models of neurodegenerative diseases. Astrocytes are another attractive target for drug discovery in neurological disorders. Astrocytes are the predominant cell type in the nervous system and play a significant role in maintaining neuronal health and homeostasis. Recently, astrocyte dysfunction has been implicated in the pathogenesis of many neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease and amyotrophic lateral sclerosis [163]. Reactive oxygen species (ROS) contribute to the progression of neurodegenerative disease, so preventing ROS-related astrocyte dysfunction and death could, in turn, help prevent neuron damage and death [164]. Similar to neurons, primary astrocytes are difficult to harvest for the adult brain and PSCs offer an attractive alternative. High-throughput phenotypic screening using human ESC-derived astrocytes was conducted with the aim of identifying compounds that could protect against oxidative stress [165]. Astrocytes were exposed to hydrogen peroxide and apoptotic nuclei quantified in 1536-well plates. In all, 4100 bioactive and approved drugs were screened and nine hits, including norcantharidin, tyrphostin A1, oxyphenbutazone and enzastaurin, were proposed as promising lead compounds for further optimization to protect from ROS-induced neurodegeneration. Finally, neuroinflammation, another hallmark of neurological disorders, is accompanied by the production of neurotoxic agents such as nitric oxide [166]. An HTS assay using a stem cell-based model of neurodegeneration induced by neuroinflammation was used to screen 44,000 new chemical entities form the LDC compound collection (Lead Discovery Center, Dortmund, Germany) and a family of small molecules was identified that shared the property of dually inhibiting both CDK-5 and GSK-3 [167,168]. These molecules protected the cytoskeleton of human neurons co-cultured with activated microglial cells and promoted survival. One compound, LDC8, showed promising results in a zebra fish model of AD. Recent models of co-culture of neurons and microglia derived from PSC should also provide useful biological substrates to screen for molecules modulating neuroinflammation-induced neurodegeneration [169].

Together, these studies demonstrate the contribution of PSC-derived models to the discovery of new axes of research for drug discovery for the two most common neurodegenerative diseases and illustrate how dynamic this new field is. However, neurons and glial cells differentiated from PSCs remain relatively immature in vitro due to the protracted

time necessary to reach full functionality. This may be a limitation of these models to study age-related phenotypes, that, by definition, appear late in life and compromise translation into clinics. Efforts have been put to reduce the time of maturation of these cells by using protocols of direct conversion with forced expression of transcription factors, as described earlier in this review, but also by promoting emergence of age-related phenotypes by exposing cells to specific proteins, such as progerin, in order to fast-forward stem-cell aging [170].

5. Psychiatric Disorders

Psychiatric disorders, including major depressive disorders (MDD), schizophrenia (SCZ) and bipolar disorder (BPD), are estimated to affect one of every three individuals during their lifetime [171,172]. MDD is one of the most common psychiatric diseases. It is characterized by profound dysregulation of affect and mood and is also associated with other abnormalities, including cognitive dysfunction, sleep and appetite disturbance, fatigue and many other metabolic, endocrine or inflammatory alterations [173]. It has been reported that nearly 5% of the population in the developed countries meets criteria for MDD. MDD is a complex and multifactorial condition involving abnormal serotonin levels in the brain, which is the main target for current treatments, but not solely [174]. Other dysregulations in MDD brains include perturbation of neurotrophins synthesis and abnormal neurogenesis throughout the lifespan in the limbic system of affected individuals [175,176]. SCZ is a chronic and debilitating psychiatric disorder characterized by hallucinations and paranoid delusions (positive symptoms), apathy and anhedonia (negative symptoms) and disordered thought processes and working memory (cognitive deficits) [177]. SCZ affects approximately 1% of the general population. The first psychotic break happens in adolescence or early adulthood and it usually develops into a chronic condition requiring lifelong treatment [178]. SCZ is believed to be a disorder of abnormal neurodevelopment [179], but the cellular processes that lead to the onset and persistence of symptoms are unknown. Genome-wide association studies have identified a number of common variants that are associated with SCZ [180,181]. Some of the pathways reported as dysregulated in these studies are involved in neural differentiation, synaptic transmission and circuit development, giving weight to the hypothesis that SCZ is a developmental disorder. BPD, also known as manic–depressive illness, is a mood disorder that also affects approximately 1% of the population and is characterized by episodes of mania and depression [182,183]. While the heritability of BPD is very high, the causative biological factors are unknown and genetic studies have only recently led to some clues. BPD is typically diagnosed in adolescence or early adulthood, suggesting that, as for SCZ, abnormal neurodevelopment may play a role in its etiology and progression [184]. Common to all psychiatric disorders, scientific investigations have been hindered by a lack of relevant cellular and animal models. Part of the reason for this is a fundamental lack of knowledge of the genetic and molecular processes underpinning the appearance and persistence of symptoms that categorize these disorders. Another reason is the existence of major differences between humans and the animal species classically used as models in the pathways controlling the development of the neuronal circuits involved in higher brain functions, that are impacted. Patient-derived stem cells provide promising new ways to overcome the obstacles to studying live neurons in the lab, document disease-related signaling pathways and reveal valuable new strategies for drug repositioning or discovery [185].

5.1. Strategies Based upon Modulation of Neurogenesis

Most psychiatric disorders are classified as neurodevelopmental disorders that affect, more specifically, neuronal circuit formation and activity; in the absence of clear molecular mechanisms to target, the first drug discovery studies involving PSCs focused on phenotypic markers in a non-disease-specific context. Neurogenesis was one of the first physiological processes targeted by such phenotypic screenings. Hippocampal neurogenesis has been demonstrated to be central in MDD pathology in animal models and current

antidepressant molecules have an activity on neurogenesis, including the gold standard fluoxetine [186,187]. Post mortem brains from BPD patients show enlarged ventricles, suggesting a loss of cortical volume, more particularly of grey matter, and volume abnormalities in the hippocampus. These volume abnormalities are ameliorated by lithium treatment [188–192]. A small but significant reduction in hippocampal volume was also reported in SCZ patients compared with healthy controls, primarily in the dentate gyrus (DG) and Cornu Ammonis 3 (CA3) hippocampal fields [193,194]. The process of neurogenesis includes neural stem cell proliferation, differentiation as neurons, then neurite outgrowth and synaptogenesis. These steps have been recapitulated in vitro using human PSCs in a format amenable to HTS. High throughput, image-based high-content analysis has been used successfully to monitor the rate of neural stem cell proliferation and their ability to differentiate as post-mitotic neurons, then develop as neuronal circuits. In at least two neuronal systems relevant to psychiatric disorders, glutamatergic neurons of the superficial layers of the cortex and cortical GABAergic interneurons, HTS has identified compounds of interest [56,92]. These studies screened collections of thousands of molecules consisting of approved drugs, well-characterized tool compounds, natural products and human metabolites. Among the hits identified, several tool compounds and approved drugs already in use for psychiatric diseases were shown to modulate neurogenesis under different aspects, including typical and atypical anti-psychotics and antidepressants. This suggests that the efficiency of these molecules may involve the modulation of neurogenesis in parallel or in synergy with their known role in dopaminergic and serotoninergic neurotransmission. In addition, screening of this type of collection provides evidence that many pathways that play role in neurogenesis, with regard to psychiatric disorder treatment, can be identified in iPSC-derived neurons using unbiased phenotypic screens, opening a path to discovering totally new chemical entities or repurposing and combining use of existing drugs.

5.2. Precision Medicine

The nosography of psychiatric disorders is mainly based on the appearance of core symptoms. The causes of symptom emergence and evolution are multiple and largely unknown. Patients vary widely in their clinical presentation along a spectrum, with some overlap between disorders and many comorbidities. In addition, common core symptoms can be attributed to different causes or result from different molecular dysregulations in the brain. Consequently, even with the same diagnosis, patients can vary in their patterns of therapeutic response to disease-specific treatments. The absence of a specific molecular signature implies delayed diagnosis, with different medications being tried on a patient until an effective regimen is identified empirically, which can often lead to disengagement and aggravation of the disease. Patient-derived neuronal circuits reconstituted in vitro from PSCs can help in identifying pertinent molecular signatures to help understand the sequence of events leading to the appearance of the symptoms and stratify the patients. The first step in such a study is to identify valid and robust disease-associated phenotypes so as to discriminate relevant patient subgroups, allowing the researcher to conduct a deeper investigation into the molecular characterization of these subgroups. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), the leading antidepressant molecules, act by regulating serotonergic neurotransmission. However, SSRI resistance is observed in approximately 30% of MDD patients. Patient stratification based on pharmacological responsiveness combined with patient-derived neurons has been used to identify alternative and complementary pharmacological strategies [195,196]. A comparison of neurons derived from MDD-affected individuals, clinically classified as good responders or non-responders to classical SSRIs, identified molecular pathways discriminating non-responders that could be the basis for a more personalized approach. An analysis of serotoninergic neuron morphology demonstrated that neurons from non-responders showed abnormal neuritic networks, while serotonin synthesis and release were not modified. Using large-scale omic strategies, the authors linked the abnormal networks to decreased expression of two cytoskeleton-associated proteins, protocadherin A6 and A8 [195]. This indicated that molecules that

restore protocadherin expression or, more indirectly, correct serotoninergic neuron morphology could be a potent alternative strategy in SSRI-resistant MDD patients. In parallel, a phenotypic analysis of the activity of forebrain glutamatergic neurons, one of the neuronal populations regulated by serotonin levels, highlighted that SSRI non-responsive neurons were hyperactive in the presence of serotonin, a phenomenon linked to the overexpression of two serotonin receptors, 5HT2A and 5HT7. Hyperactivity can be normalized using lurasidone, an FDA-approved selective 5HT2A receptor antagonist, indicating that this complementary pharmacotherapy can be adapted for some MDD patients [196]. Similar strategies were employed to model lithium resistance in BPD. Depending on the cohort studied, 30–50% of BPD patients did not respond to lithium, considered the gold standard of mood stabilizers [197,198]. Lithium resistance was modelled in hippocampal neurons that were differentiated from individuals with BPD and controls selected from two cohorts in order to examine neuronal action potential firing. This revealed a hyperexcitability profile in action potentials in immature neurons in BPD patients. Importantly, this in vitro hyperexcitable phenotype was reversed with lithium in neurons derived from patients who had responded to lithium treatment clinically, but not in neurons from patients who had failed to respond therapeutically to lithium. This suggests that hyperexcitability in immature hippocampal neurons may be a pathophysiological feature in BPD and could serve as a criterion to identify new therapeutic compounds [199]. Further analyses demonstrated that lithium treatment failed to activate LEF-1, a downstream effector of Wnt/beta-catenin signaling, in neurons from BPD patients who did not respond to it. Interestingly, valproic acid, used as an alternative to lithium, activated LEF-1 and was efficient in normalizing hyperexcitability in neurons of lithium-resistant patients [200]. This suggests that compound screening based on the LEF-1 reporter system could be a valuable tool to identify new treatments for BPD [201].

6. Concluding Remarks

PSC-derived neural cells offer a new and potent strategy to discover new pharmacological therapies for neurological diseases. Improved and standardized in vitro differentiation protocols, allowing a variety of otherwise inaccessible brain cell types to be studied, provide a foundation for establishing cellular models highly relevant to human pathologies. Proof-of-concept of the high transferability of PSC models in rare genetic disorders have been established. These studies have successfully demonstrated that this type of humanized cell-based model, anchored in a human disease-relevant cell type, could respond accurately to an endogenous stimulus such as a disease-causing mutation and a measurable, translatable endpoint that could also be monitored in patients. Successful repositioning of marketed drugs has strengthened these results. These experimental paradigms have been successfully applied to molecular target-based screening for the most prevalent devastating neurodegenerative diseases using patient-derived iPSCs obtained not only from familial cases but also, most importantly, from idiopathic cases. Next to the conventional molecular target-based approaches, patient-derived neuronal circuits have shown potential as biological tools for developing personalized or precision medicine approaches by opening the field of phenotypic screening in diseases previously considered inaccessible, such as psychiatric disorders, even in absence of clear molecular mechanisms involved in the emergence of the phenotype. PSC models are dynamic and allow researchers to reconstitute the progressive evolution of a disease, i.e., to dissect the sequence of molecular events leading from the initial trigger to the ultimate phenotypes (cell death in the case of neurodegenerative diseases, abnormal neuronal network activity in the case of neurodevelopmental disorders and psychiatric diseases). Each step can serve as a read-out for HTS. The typical screening cascade would be to perform the HTS on the earliest events, then to validate that the selected hits efficiently block disease progression by evaluating their efficacy on latter phenotypes.

In the future, the combination of PSCs with other powerful technologies will continue to show potential for drug discovery. Organoids and, more generally, 3D cultures, have

begun to facilitate the generation of more mature and functional cell types (Sharma et al., 2020). Organoids generated with iPSCs recapitulate embryonic development to create self-organized 3D structures that replicate the complexity of specific organs. This technology can be beneficial for studying disorders in which developmental processes or multiple cell types within an organ are affected and for evaluating the potential of small molecules [98,202]. The CRISPR/Cas9 gene editing system has enabled unbiased and large-scale genetic perturbation screens to identify causative pathways by knocking out many genes in parallel and selecting cells with the desired phenotype. The combination of CRISPR screens with PSC technology would create a powerful tool to identify disease-causative or -modifying genes and pathways to be targeted by candidate drugs or involved in the mechanism of action of these drugs, at large scale and in an unbiased manner [203,204]. With the production of PSC-derived progenies being highly scalable, these cells can be used for comparative omic analysis, including bulk and single-cell RNA sequencing. This would enable detailed comparisons of controls and disease-affected cells to identify new pathways, to explain drug mechanism of action and to establish genetic profiles of good and bad responders to a given treatment. Finally, artificial intelligence and machine learning tools offer the promise of revolutionizing drug development [205]. With multiparametric profiling, the measured phenotypic changes in neuronal circuits can effectively serve as information packages summarizing cellular responses to pathological conditions or compound treatments. Artificial intelligence tools can harness the strengths of phenotypic assays leveraging the rich information reflected in phenotypic cellular changes to shed light on novel compounds and to expand our biological understanding. The expectation is that the implementation of these technologies over the past five years should begin to translate into an increased probability of success for individual drug discovery programs that use them. PSC models in drug discovery for neurological disorders is steadily transitioning from novel to mainstream.

Author Contributions: A.B., review of the literature, writing; M.L. and J.T., review of the literature. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: M.L. received a PhD grant from the French Ministry of Science and Technology. I-Stem is part of the Biotherapies Institute for Rare Diseases (BIRD) and is supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Disease, G.B.D.; Injury, I.; Prevalence, C. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* **2017**, *390*, 1211–1259. [CrossRef]
2. Zecevic, N.; Chen, Y.; Filipovic, R. Contributions of cortical subventricular zone to the development of the human cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* **2005**, *491*, 109–122. [CrossRef] [PubMed]
3. Fietz, S.A.; Kelava, I.; Vogt, J.; Wilsch-Brauninger, M.; Stenzel, D.; Fish, J.L.; Corbeil, D.; Riehn, A.; Distler, W.; Nitsch, R.; et al. OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. *Nat. Neurosci.* **2010**, *13*, 690–699. [CrossRef]
4. Hansen, D.V.; Lui, J.H.; Parker, P.R.; Kriegstein, A.R. Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature* **2010**, *464*, 554–561. [CrossRef] [PubMed]
5. Fietz, S.A.; Huttner, W.B. Cortical progenitor expansion, self-renewal and neurogenesis-a polarized perspective. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2011**, *21*, 23–35. [CrossRef]
6. Lui, J.H.; Hansen, D.V.; Kriegstein, A.R. Development and evolution of the human neocortex. *Cell* **2011**, *146*, 18–36. [CrossRef]
7. Logan, S.; Arzua, T.; Canfield, S.G.; Seminary, E.R.; Sison, S.L.; Ebert, A.D.; Bai, X. Studying Human Neurological Disorders Using Induced Pluripotent Stem Cells: From 2D Monolayer to 3D Organoid and Blood Brain Barrier Models. *Compr. Physiol.* **2019**, *9*, 565–611. [CrossRef]
8. Thomson, J.A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S.S.; Waknitz, M.A.; Swiergiel, J.J.; Marshall, V.S.; Jones, J.M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **1998**, *282*, 1145–1147. [CrossRef]
9. Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **2007**, *131*, 861–872. [CrossRef]

10. Cheng, L.; Lei, Q.; Yin, C.; Wang, H.Y.; Jin, K.; Xiang, M. Generation of Urine Cell-Derived Non-integrative Human iPSCs and iNSCs: A Step-by-Step Optimized Protocol. *Front. Mol. Neurosci.* **2017**, *10*, 348. [CrossRef]
11. Raab, S.; Klingenstein, M.; Liebau, S.; Linta, L. A Comparative View on Human Somatic Cell Sources for iPSC Generation. *Stem Cells Int.* **2014**, *2014*, 768391. [CrossRef]
12. Rim, Y.A.; Nam, Y.; Ju, J.H. Induced Pluripotent Stem Cell Generation from Blood Cells Using Sendai Virus and Centrifugation. *J. Vis. Exp. JoVE* **2016**. [CrossRef]
13. Wang, J.; Gu, Q.; Hao, J.; Bai, D.; Liu, L.; Zhao, X.; Liu, Z.; Wang, L.; Zhou, Q. Generation of induced pluripotent stem cells with high efficiency from human umbilical cord blood mononuclear cells. *Genom. Proteom. Bioinform.* **2013**, *11*, 304–311. [CrossRef]
14. Deng, J.; Shoemaker, R.; Xie, B.; Gore, A.; LeProust, E.M.; Antosiewicz-Bourget, J.; Egli, D.; Maherali, N.; Park, I.H.; Yu, J.; et al. Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 353–360. [CrossRef]
15. Kim, K.; Doi, A.; Wen, B.; Ng, K.; Zhao, R.; Cahan, P.; Kim, J.; Aryee, M.J.; Ji, H.; Ehrlich, L.I.; et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* **2010**, *467*, 285–290. [CrossRef]
16. Sams-Dodd, F. Drug discovery: Selecting the optimal approach. *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 465–472. [CrossRef] [PubMed]
17. Bellomo, F.; Medina, D.L.; De Leo, E.; Panarella, A.; Emma, F. High-content drug screening for rare diseases. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2017**, *40*, 601–607. [CrossRef] [PubMed]
18. Hernandez-Sapiens, M.A.; Reza-Zaldivar, E.E.; Cevallos, R.R.; Marquez-Aguirre, A.L.; Gazarian, K.; Canales-Aguirre, A.A. A Three-Dimensional Alzheimer's Disease Cell Culture Model Using iPSC-Derived Neurons Carrying A246E Mutation in PSEN1. *Front. Cell. Neurosci.* **2020**, *14*, 151. [CrossRef]
19. Sekiguchi, M.; Sobue, A.; Kushima, I.; Wang, C.; Arioka, Y.; Kato, H.; Kodama, A.; Kubo, H.; Ito, N.; Sawahata, M.; et al. ARHGAP10, which encodes Rho GTPase-activating protein 10, is a novel gene for schizophrenia risk. *Transl. Psychiatry* **2020**, *10*, 247. [CrossRef] [PubMed]
20. Yamaguchi, A.; Ishikawa, K.I.; Inoshita, T.; Shiba-Fukushima, K.; Saiki, S.; Hatano, T.; Mori, A.; Oji, Y.; Okuzumi, A.; Li, Y.; et al. Identifying Therapeutic Agents for Amelioration of Mitochondrial Clearance Disorder in Neurons of Familial Parkinson Disease. *Stem Cell Rep.* **2020**, *14*, 1060–1075. [CrossRef]
21. Fotis, C.; Antoranz, A.; Hatziavramidis, D.; Sakellaropoulos, T.; Alexopoulos, L.G. Network-based technologies for early drug discovery. *Drug Discov. Today* **2018**, *23*, 626–635. [CrossRef]
22. Caudle, W.M.; Bammler, T.K.; Lin, Y.; Pan, S.; Zhang, J. Using 'omics' to define pathogenesis and biomarkers of Parkinson's disease. *Expert Rev. Neurother.* **2010**, *10*, 925–942. [CrossRef]
23. Lang, C.; Campbell, K.R.; Ryan, B.J.; Carling, P.; Attar, M.; Vowles, J.; Perestenko, O.V.; Bowden, R.; Baig, F.; Kasten, M.; et al. Single-Cell Sequencing of iPSC-Dopamine Neurons Reconstructs Disease Progression and Identifies HDAC4 as a Regulator of Parkinson Cell Phenotypes. *Cell Stem Cell* **2019**, *24*, 93–106. [CrossRef] [PubMed]
24. Shepard, C.J.; Cline, S.G.; Hinds, D.; Jahanbakhsh, S.; Prokop, J.W. Breakdown of multiple sclerosis genetics to identify an integrated disease network and potential variant mechanisms. *Physiol. Genom.* **2019**, *51*, 562–577. [CrossRef]
25. Aldosary, M.; Al-Bakheet, A.; Al-Dhalaan, H.; Almass, R.; Alsagob, M.; Al-Younes, B.; AlQuait, L.; Mustafa, O.M.; Bulbul, M.; Rahbeeni, Z.; et al. Rett Syndrome, a Neurodevelopmental Disorder, Whole-Transcriptome, and Mitochondrial Genome Multiomics Analyses Identify Novel Variations and Disease Pathways. *Omics A J. Integr. Biol.* **2020**, *24*, 160–171. [CrossRef]
26. Neul, J.L.; Skinner, S.A.; Annese, F.; Lane, J.; Heydemann, P.; Jones, M.; Kaufmann, W.E.; Glaze, D.G.; Percy, A.K. Metabolic Signatures Differentiate Rett Syndrome From Unaffected Siblings. *Front. Integr. Neurosci.* **2020**, *14*, 7. [CrossRef] [PubMed]
27. Fernandez-Santiago, R.; Carballo-Carbajal, I.; Castellano, G.; Torrent, R.; Richaud, Y.; Sanchez-Danes, A.; Vilarrasa-Blasi, R.; Sanchez-Pla, A.; Mosquera, J.L.; Soriano, J.; et al. Aberrant epigenome in iPSC-derived dopaminergic neurons from Parkinson's disease patients. *EMBO Mol. Med.* **2015**, *7*, 1529–1546. [CrossRef]
28. Focking, M.; Doyle, B.; Munawar, N.; Dillon, E.T.; Cotter, D.; Cagney, G. Epigenetic Factors in Schizophrenia: Mechanisms and Experimental Approaches. *Mol. Neuropsychiatry* **2019**, *5*, 6–12. [CrossRef] [PubMed]
29. Ramanan, V.K.; Saykin, A.J. Pathways to neurodegeneration: Mechanistic insights from GWAS in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and related disorders. *Am. J. Neurodegener. Dis.* **2013**, *2*, 145–175.
30. Sadlon, A.; Takousis, P.; Alexopoulos, P.; Evangelou, E.; Prokopenko, I.; Perneczky, R. miRNAs Identify Shared Pathways in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Trends Mol. Med.* **2019**, *25*, 662–672. [CrossRef]
31. Szatmari, B.; Balicza, P.; Nemeth, G.; Molnar, M.J. The Panomics Approach in Neurodegenerative Disorders. *Curr. Med. Chem.* **2019**, *26*, 1712–1720. [CrossRef] [PubMed]
32. Varma, H.; Lo, D.C.; Stockwell, B.R. High throughput screening for neurodegeneration and complex disease phenotypes. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2008**, *11*, 238–248. [CrossRef]
33. Charoenkwan, P.; Hwang, E.; Cutler, R.W.; Lee, H.C.; Ko, L.W.; Huang, H.L.; Ho, S.Y. HCS-Neurons: Identifying phenotypic changes in multi-neuron images upon drug treatments of high-content screening. *BMC Bioinform.* **2013**, *14* (Suppl. 16), S12. [CrossRef]
34. Cooper, D.J.; Zunino, G.; Bixby, J.L.; Lemmon, V.P. Phenotypic screening with primary neurons to identify drug targets for regeneration and degeneration. *Mol. Cell. Neurosci.* **2017**, *80*, 161–169. [CrossRef]
35. Ashburn, T.T.; Thor, K.B. Drug repositioning: Identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 673–683. [CrossRef] [PubMed]

36. Wermuth, C.G. Selective optimization of side activities: Another way for drug discovery. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1303–1314. [CrossRef] [PubMed]
37. Corsello, S.M.; Bittker, J.A.; Liu, Z.; Gould, J.; McCarren, P.; Hirschman, J.E.; Johnston, S.E.; Vrcic, A.; Wong, B.; Khan, M.; et al. The Drug Repurposing Hub: A next-generation drug library and information resource. *Nat. Med.* **2017**, *23*, 405–408. [CrossRef]
38. Schein, C.H. Repurposing approved drugs on the pathway to novel therapies. *Med. Res. Rev.* **2020**, *40*, 586–605. [CrossRef]
39. Roessler, H.I.; Knoers, N.; van Haelst, M.M.; van Haaften, G. Drug Repurposing for Rare Diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* **2021**, *42*, 255–267. [CrossRef]
40. Scherman, D.; Fetro, C. Drug repositioning for rare diseases: Knowledge-based success stories. *Therapie* **2020**, *75*, 161–167. [CrossRef]
41. Chambers, S.M.; Fasano, C.A.; Papapetrou, E.P.; Tomishima, M.; Sadelain, M.; Studer, L. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 275–280. [CrossRef]
42. Boissart, C.; Nissan, X.; Giraud-Triboult, K.; Peschanski, M.; Benchoua, A. miR-125 potentiates early neural specification of human embryonic stem cells. *Development* **2012**, *139*, 1247–1257. [CrossRef]
43. Tao, Y.; Zhang, S.C. Neural Subtype Specification from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* **2016**, *19*, 573–586. [CrossRef] [PubMed]
44. Kirkeby, A.; Nelander, J.; Parmar, M. Generating regionalized neuronal cells from pluripotency, a step-by-step protocol. *Front. Cell. Neurosci.* **2012**, *6*, 64. [CrossRef] [PubMed]
45. Borghese, L.; Dolezalova, D.; Opitz, T.; Haupt, S.; Leinhaas, A.; Steinfarz, B.; Koch, P.; Edenhofer, F.; Hampl, A.; Brustle, O. Inhibition of notch signaling in human embryonic stem cell-derived neural stem cells delays G1/S phase transition and accelerates neuronal differentiation in vitro and in vivo. *Stem Cells* **2010**, *28*, 955–964. [CrossRef]
46. McComish, S.F.; Caldwell, M.A. Generation of defined neural populations from pluripotent stem cells. *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* **2018**, *373*, 20170214. [CrossRef]
47. Silva, M.C.; Haggarty, S.J. Human pluripotent stem cell-derived models and drug screening in CNS precision medicine. *Ann. New York Acad. Sci.* **2020**, *1471*, 18–56. [CrossRef]
48. Sarkar, A.; Mei, A.; Paquola, A.C.M.; Stern, S.; Bardy, C.; Klug, J.R.; Kim, S.; Neshat, N.; Kim, H.J.; Ku, M.; et al. Efficient Generation of CA3 Neurons from Human Pluripotent Stem Cells Enables Modeling of Hippocampal Connectivity In Vitro. *Cell Stem Cell* **2018**, *22*, 684–697. [CrossRef] [PubMed]
49. Rajamani, U.; Gross, A.R.; Hjelm, B.E.; Sequeira, A.; Vawter, M.P.; Tang, J.; Gangalapudi, V.; Wang, Y.; Andres, A.M.; Gottlieb, R.A.; et al. Super-Obese Patient-Derived iPSC Hypothalamic Neurons Exhibit Obesogenic Signatures and Hormone Responses. *Cell Stem Cell* **2018**, *22*, 698–712. [CrossRef]
50. Liu, Y.; Liu, H.; Sauvey, C.; Yao, L.; Zarnowska, E.D.; Zhang, S.C. Directed differentiation of forebrain GABA interneurons from human pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 1670–1679. [CrossRef]
51. Maroof, A.M.; Keros, S.; Tyson, J.A.; Ying, S.W.; Ganat, Y.M.; Merkle, F.T.; Liu, B.; Goulburn, A.; Stanley, E.G.; Elefanty, A.G.; et al. Directed differentiation and functional maturation of cortical interneurons from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **2013**, *12*, 559–572. [CrossRef]
52. Kumar, M.; Kaushalya, S.K.; Gressens, P.; Maiti, S.; Mani, S. Optimized derivation and functional characterization of 5-HT neurons from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* **2009**, *18*, 615–627. [CrossRef] [PubMed]
53. Lu, J.; Zhong, X.; Liu, H.; Hao, L.; Huang, C.T.; Sherafat, M.A.; Jones, J.; Ayala, M.; Li, L.; Zhang, S.C. Generation of serotonin neurons from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* **2016**, *34*, 89–94. [CrossRef]
54. Kriks, S.; Shim, J.W.; Piao, J.; Ganat, Y.M.; Wakeman, D.R.; Xie, Z.; Carrillo-Reid, L.; Auyeung, G.; Antonacci, C.; Buch, A.; et al. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* **2011**, *480*, 547–551. [CrossRef]
55. Shi, Y.; Kirwan, P.; Livesey, F.J. Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks. *Nat. Protoc.* **2012**, *7*, 1836–1846. [CrossRef] [PubMed]
56. Boissart, C.; Poulet, A.; Georges, P.; Darville, H.; Julita, E.; Delorme, R.; Bourgeron, T.; Peschanski, M.; Benchoua, A. Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening. *Transl. Psychiatry* **2013**, *3*, e294. [CrossRef]
57. Qi, Y.; Zhang, X.J.; Renier, N.; Wu, Z.; Atkin, T.; Sun, Z.; Ozair, M.Z.; Tchieu, J.; Zimmer, B.; Fattahi, F.; et al. Combined small-molecule inhibition accelerates the derivation of functional cortical neurons from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 154–163. [CrossRef]
58. Maury, Y.; Come, J.; Piskorowski, R.A.; Salah-Mohellibi, N.; Chevaleyre, V.; Peschanski, M.; Martinat, C.; Nedelec, S. Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes. *Nat. Biotechnol.* **2015**, *33*, 89–96. [CrossRef] [PubMed]
59. Sances, S.; Bruijn, L.I.; Chandran, S.; Eggan, K.; Ho, R.; Klim, J.R.; Livesey, M.R.; Lowry, E.; Macklis, J.D.; Rushton, D.; et al. Modeling ALS with motor neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *Nat. Neurosci.* **2016**, *19*, 542–553. [CrossRef]
60. Bradley, R.A.; Shireman, J.; McFalls, C.; Choi, J.; Canfield, S.G.; Dong, Y.; Liu, K.; Lisota, B.; Jones, J.R.; Petersen, A.; et al. Regionally specified human pluripotent stem cell-derived astrocytes exhibit different molecular signatures and functional properties. *Development* **2019**, *146*, dev170910. [CrossRef] [PubMed]

61. Leventoux, N.; Morimoto, S.; Imaizumi, K.; Sato, Y.; Takahashi, S.; Mashima, K.; Ishikawa, M.; Sonn, I.; Kondo, T.; Watanabe, H.; et al. Human Astrocytes Model Derived from Induced Pluripotent Stem Cells. *Cells* **2020**, *9*, 2680. [CrossRef]
62. Canals, I.; Ginisty, A.; Quist, E.; Timmerman, R.; Fritze, J.; Miskinyte, G.; Monni, E.; Hansen, M.G.; Hidalgo, I.; Bryder, D.; et al. Rapid and efficient induction of functional astrocytes from human pluripotent stem cells. *Nat. Methods* **2018**, *15*, 693–696. [CrossRef]
63. Emdad, L.; D'Souza, S.L.; Kothari, H.P.; Qadeer, Z.A.; Germano, I.M. Efficient differentiation of human embryonic and induced pluripotent stem cells into functional astrocytes. *Stem Cells Dev.* **2012**, *21*, 404–410. [CrossRef] [PubMed]
64. Roybon, L.; Lamas, N.J.; Garcia, A.D.; Yang, E.J.; Sattler, R.; Lewis, V.J.; Kim, Y.A.; Kachel, C.A.; Rothstein, J.D.; Przedborski, S.; et al. Human stem cell-derived spinal cord astrocytes with defined mature or reactive phenotypes. *Cell Rep.* **2013**, *4*, 1035–1048. [CrossRef] [PubMed]
65. Gorris, R.; Fischer, J.; Erwes, K.L.; Kesavan, J.; Peterson, D.A.; Alexander, M.; Nothen, M.M.; Peitz, M.; Quandel, T.; Karus, M.; et al. Pluripotent stem cell-derived radial glia-like cells as stable intermediate for efficient generation of human oligodendrocytes. *Glia* **2015**, *63*, 2152–2167. [CrossRef]
66. Wang, S.; Bates, J.; Li, X.; Schanz, S.; Chandler-Militello, D.; Levine, C.; Maherali, N.; Studer, L.; Hochedlinger, K.; Windrem, M.; et al. Human iPSC-derived oligodendrocyte progenitor cells can myelinate and rescue a mouse model of congenital hypomyelination. *Cell Stem Cell* **2013**, *12*, 252–264. [CrossRef] [PubMed]
67. Major, T.; Powers, A.; Tabar, V. Derivation of telencephalic oligodendrocyte progenitors from human pluripotent stem cells. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* **2017**, *39*, 1H1011–1H1023. [CrossRef]
68. Espinosa-Jeffrey, A.; Blanchi, B.; Biancotti, J.C.; Kumar, S.; Hirose, M.; Mandefro, B.; Talavera-Adame, D.; Benvenisty, N.; de Vellis, J. Efficient Generation of Viral and Integration-Free Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Oligodendrocytes. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* **2016**, *39*, 2D1811–2D1828. [CrossRef]
69. Muffat, J.; Li, Y.; Yuan, B.; Mitalipova, M.; Omer, A.; Corcoran, S.; Bakiasi, G.; Tsai, L.H.; Aubourg, P.; Ransohoff, R.M.; et al. Efficient derivation of microglia-like cells from human pluripotent stem cells. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 1358–1367. [CrossRef]
70. Abud, E.M.; Ramirez, R.N.; Martinez, E.S.; Healy, L.M.; Nguyen, C.H.H.; Newman, S.A.; Yeromin, A.V.; Scarfone, V.M.; Marsh, S.E.; Fimbres, C.; et al. iPSC-Derived Human Microglia-like Cells to Study Neurological Diseases. *Neuron* **2017**, *94*, 278–293. [CrossRef]
71. Douvaras, P.; Sun, B.; Wang, M.; Kruglikov, I.; Lallos, G.; Zimmer, M.; Terrenoire, C.; Zhang, B.; Gandy, S.; Schadt, E.; et al. Directed Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells to Microglia. *Stem Cell Rep.* **2017**, *8*, 1516–1524. [CrossRef]
72. Mancuso, R.; Van Den Daele, J.; Fattorelli, N.; Wolfs, L.; Balusu, S.; Burton, O.; Liston, A.; Sierksma, A.; Fourne, Y.; Poovathingal, S.; et al. Stem-cell-derived human microglia transplanted in mouse brain to study human disease. *Nat. Neurosci.* **2019**, *22*, 2111–2116. [CrossRef]
73. Di Domenico, A.; Carola, G.; Calatayud, C.; Pons-Espinal, M.; Munoz, J.P.; Richaud-Patin, Y.; Fernandez-Carasa, I.; Gut, M.; Faella, A.; Parameswaran, J.; et al. Patient-Specific iPSC-Derived Astrocytes Contribute to Non-Cell-Autonomous Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *Stem Cell Rep.* **2019**, *12*, 213–229. [CrossRef]
74. Russo, F.B.; Freitas, B.C.; Pignatari, G.C.; Fernandes, I.R.; Sebat, J.; Muotri, A.R.; Beltrao-Braga, P.C.B. Modeling the Interplay Between Neurons and Astrocytes in Autism Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Biol. Psychiatry* **2018**, *83*, 569–578. [CrossRef]
75. Tsunemi, T.; Ishiguro, Y.; Yoroisaka, A.; Valdez, C.; Miyamoto, K.; Ishikawa, K.; Saiki, S.; Akamatsu, W.; Hattori, N.; Krainc, D. Astrocytes Protect Human Dopaminergic Neurons from alpha-Synuclein Accumulation and Propagation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **2020**, *40*, 8618–8628. [CrossRef]
76. Smethurst, P.; Risse, E.; Tyzack, G.E.; Mitchell, J.S.; Taha, D.M.; Chen, Y.R.; Newcombe, J.; Collinge, J.; Sidle, K.; Patani, R. Distinct responses of neurons and astrocytes to TDP-43 proteinopathy in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain A J. Neurol.* **2020**, *143*, 430–440. [CrossRef]
77. Ishii, M.N.; Yamamoto, K.; Shoji, M.; Asami, A.; Kawamata, Y. Human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-derived neurons respond to convulsant drugs when co-cultured with hiPSC-derived astrocytes. *Toxicology* **2017**, *389*, 130–138. [CrossRef]
78. Gupta, K.; Patani, R.; Baxter, P.; Serio, A.; Story, D.; Tsujita, T.; Hayes, J.D.; Pedersen, R.A.; Hardingham, G.E.; Chandran, S. Human embryonic stem cell derived astrocytes mediate non-cell-autonomous neuroprotection through endogenous and drug-induced mechanisms. *Cell Death Differ.* **2012**, *19*, 779–787. [CrossRef]
79. Zhao, C.; Devlin, A.C.; Chouhan, A.K.; Selvaraj, B.T.; Stavrou, M.; Burr, K.; Brivio, V.; He, X.; Mehta, A.R.; Story, D.; et al. Mutant C9orf72 human iPSC-derived astrocytes cause non-cell autonomous motor neuron pathophysiology. *Glia* **2020**, *68*, 1046–1064. [CrossRef]
80. Mizuno, G.O.; Wang, Y.; Shi, G.; Wang, Y.; Sun, J.; Papadopoulos, S.; Broussard, G.J.; Unger, E.K.; Deng, W.; Weick, J.; et al. Aberrant Calcium Signaling in Astrocytes Inhibits Neuronal Excitability in a Human Down Syndrome Stem Cell Model. *Cell Rep.* **2018**, *24*, 355–365. [CrossRef]
81. Chen, C.; Jiang, P.; Xue, H.; Peterson, S.E.; Tran, H.T.; McCann, A.E.; Parast, M.M.; Li, S.; Pleasure, D.E.; Laurent, L.C.; et al. Role of astroglia in Down's syndrome revealed by patient-derived human-induced pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 4430. [CrossRef]
82. Dooves, S.; Nadadhur, A.G.; Gasparotto, L.; Heine, V.M. Co-culture of Human Stem Cell Derived Neurons and Oligodendrocyte Progenitor Cells. *Bio-Protoc.* **2019**, *9*, e3350. [CrossRef]

83. Zhang, Y.; Pak, C.; Han, Y.; Ahlenius, H.; Zhang, Z.; Chanda, S.; Marro, S.; Patzke, C.; Acuna, C.; Covy, J.; et al. Rapid single-step induction of functional neurons from human pluripotent stem cells. *Neuron* **2013**, *78*, 785–798. [CrossRef] [PubMed]
84. Sun, A.X.; Yuan, Q.; Tan, S.; Xiao, Y.; Wang, D.; Khoo, A.T.; Sani, L.; Tran, H.D.; Kim, P.; Chiew, Y.S.; et al. Direct Induction and Functional Maturation of Forebrain GABAergic Neurons from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep.* **2016**, *16*, 1942–1953. [CrossRef] [PubMed]
85. Yang, N.; Chanda, S.; Marro, S.; Ng, Y.H.; Janas, J.A.; Haag, D.; Ang, C.E.; Tang, Y.; Flores, Q.; Mall, M.; et al. Generation of pure GABAergic neurons by transcription factor programming. *Nat. Methods* **2017**, *14*, 621–628. [CrossRef]
86. Theka, I.; Caiazzo, M.; Dvoretskova, E.; Leo, D.; Ungaro, F.; Curreli, S.; Manago, F.; Dell'Anno, M.T.; Pezzoli, G.; Gainetdinov, R.R.; et al. Rapid generation of functional dopaminergic neurons from human induced pluripotent stem cells through a single-step procedure using cell lineage transcription factors. *Stem Cells Transl. Med.* **2013**, *2*, 473–479. [CrossRef] [PubMed]
87. Hester, M.E.; Murtha, M.J.; Song, S.; Rao, M.; Miranda, C.J.; Meyer, K.; Tian, J.; Boulting, G.; Schaffer, D.V.; Zhu, M.X.; et al. Rapid and efficient generation of functional motor neurons from human pluripotent stem cells using gene delivered transcription factor codes. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **2011**, *19*, 1905–1912. [CrossRef]
88. Efthymiou, A.; Shaltouki, A.; Steiner, J.P.; Jha, B.; Heman-Ackah, S.M.; Swistowski, A.; Zeng, X.; Rao, M.S.; Malik, N. Functional screening assays with neurons generated from pluripotent stem cell-derived neural stem cells. *J. Biomol. Screen.* **2014**, *19*, 32–43. [CrossRef]
89. Pei, Y.; Peng, J.; Behl, M.; Sipes, N.S.; Shockley, K.R.; Rao, M.S.; Tice, R.R.; Zeng, X. Comparative neurotoxicity screening in human iPSC-derived neural stem cells, neurons and astrocytes. *Brain Res.* **2016**, *1638*, 57–73. [CrossRef]
90. Lorenz, C.; Lesimple, P.; Bukowiecki, R.; Zink, A.; Inak, G.; Mlody, B.; Singh, M.; Semtner, M.; Mah, N.; Aure, K.; et al. Human iPSC-Derived Neural Progenitors Are an Effective Drug Discovery Model for Neurological mtDNA Disorders. *Cell Stem Cell* **2017**, *20*, 659–674. [CrossRef]
91. Odawara, A.; Matsuda, N.; Ishibashi, Y.; Yokoi, R.; Suzuki, I. Toxicological evaluation of convulsant and anticonvulsant drugs in human induced pluripotent stem cell-derived cortical neuronal networks using an MEA system. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 10416. [CrossRef]
92. Sherman, S.P.; Bang, A.G. High-throughput screen for compounds that modulate neurite growth of human induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Dis. Models Mech.* **2018**, *11*, dmm031906. [CrossRef]
93. Calabrese, B.; Powers, R.M.; Slepian, A.J.; Halpain, S. Post-differentiation Replating of Human Pluripotent Stem Cell-derived Neurons for High-content Screening of Neuritogenesis and Synapse Maturation. *J. Vis. Exp. JoVE* **2019**. [CrossRef]
94. Little, D.; Luft, C.; Pezzini-Picart, O.; Mosaku, O.; Ketteler, R.; Devine, M.J.; Gissen, P. Seeding Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neurons onto 384-Well Plates. *Methods Mol. Biol.* **2019**, *1994*, 159–164. [CrossRef]
95. Sridharan, B.; Hubbs, C.; Llamosas, N.; Kilinc, M.; Singhera, F.U.; Willems, E.; Piper, D.R.; Scampavia, L.; Rumbaugh, G.; Spicer, T.P. A Simple Procedure for Creating Scalable Phenotypic Screening Assays in Human Neurons. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 9000. [CrossRef]
96. Traub, S.; Heilker, R. hiPS Cell-Derived Neurons for High-Throughput Screening. *Methods Mol. Biol.* **2019**, *1994*, 243–263. [CrossRef]
97. Garcia-Leon, J.A.; Caceres-Palomo, L.; Sanchez-Mejias, E.; Mejias-Ortega, M.; Nunez-Diaz, C.; Fernandez-Valenzuela, J.J.; Sanchez-Varo, R.; Davila, J.C.; Vitorica, J.; Gutierrez, A. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Cells as a Relevant Platform for Drug Screening in Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6867. [CrossRef]
98. Boussaad, I.; Cruciani, G.; Bolognin, S.; Antony, P.; Dording, C.M.; Kwon, Y.J.; Heutink, P.; Fava, E.; Schwamborn, J.C.; Kruger, R. Integrated, automated maintenance, expansion and differentiation of 2D and 3D patient-derived cellular models for high throughput drug screening. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 1439. [CrossRef]
99. Pogue, R.E.; Cavalcanti, D.P.; Shanker, S.; Andrade, R.V.; Aguiar, L.R.; de Carvalho, J.L.; Costa, F.F. Rare genetic diseases: Update on diagnosis, treatment and online resources. *Drug Discov. Today* **2018**, *23*, 187–195. [CrossRef]
100. Pasca, S.P.; Portmann, T.; Voineagu, I.; Yazawa, M.; Shcheglovitov, A.; Pasca, A.M.; Cord, B.; Palmer, T.D.; Chikahisa, S.; Nishino, S.; et al. Using iPSC-derived neurons to uncover cellular phenotypes associated with Timothy syndrome. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1657–1662. [CrossRef]
101. Aflaki, E.; Borger, D.K.; Moaven, N.; Stubblefield, B.K.; Rogers, S.A.; Patnaik, S.; Schoenen, F.J.; Westbroek, W.; Zheng, W.; Sullivan, P.; et al. A New Glucocerebrosidase Chaperone Reduces alpha-Synuclein and Glycolipid Levels in iPSC-Derived Dopaminergic Neurons from Patients with Gaucher Disease and Parkinsonism. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **2016**, *36*, 7441–7452. [CrossRef]
102. Codazzi, F.; Hu, A.; Rai, M.; Donatello, S.; Salerno Scarzella, F.; Mangiameli, E.; Pelizzoni, I.; Grohovaz, F.; Pandolfo, M. Friedreich ataxia-induced pluripotent stem cell-derived neurons show a cellular phenotype that is corrected by a benzamide HDAC inhibitor. *Hum. Mol. Genet.* **2016**, *25*, 4847–4855. [CrossRef]
103. Long, Y.; Xu, M.; Li, R.; Dai, S.; Beers, J.; Chen, G.; Soheilian, F.; Baxa, U.; Wang, M.; Marugan, J.J.; et al. Induced Pluripotent Stem Cells for Disease Modeling and Evaluation of Therapeutics for Niemann-Pick Disease Type A. *Stem Cells Transl. Med.* **2016**, *5*, 1644–1655. [CrossRef]
104. Kaufmann, M.; Schuffenhauer, A.; Fruh, I.; Klein, J.; Thiemeyer, A.; Rigo, P.; Gomez-Mancilla, B.; Heidinger-Millot, V.; Bouwmeester, T.; Schopfer, U.; et al. High-Throughput Screening Using iPSC-Derived Neuronal Progenitors to Identify Compounds Counteracting Epigenetic Gene Silencing in Fragile X Syndrome. *J. Biomol. Screen.* **2015**, *20*, 1101–1111. [CrossRef]

105. Kumari, D.; Swaroop, M.; Southall, N.; Huang, W.; Zheng, W.; Usdin, K. High-Throughput Screening to Identify Compounds That Increase Fragile X Mental Retardation Protein Expression in Neural Stem Cells Differentiated From Fragile X Syndrome Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Transl. Med.* **2015**, *4*, 800–808. [CrossRef]
106. Li, M.; Zhao, H.; Ananiev, G.E.; Musser, M.T.; Ness, K.H.; Maglaque, D.L.; Saha, K.; Bhattacharyya, A.; Zhao, X. Establishment of Reporter Lines for Detecting Fragile X Mental Retardation (FMR1) Gene Reactivation in Human Neural Cells. *Stem Cells* **2017**, *35*, 158–169. [CrossRef] [PubMed]
107. Cavallo, F.; Troglio, F.; Faga, G.; Fancelli, D.; Shyti, R.; Trattaro, S.; Zanella, M.; D'Agostino, G.; Hughes, J.M.; Cera, M.R.; et al. High-throughput screening identifies histone deacetylase inhibitors that modulate GTF2I expression in 7q11.23 microduplication autism spectrum disorder patient-derived cortical neurons. *Mol. Autism* **2020**, *11*, 88. [CrossRef]
108. Goldson, E.; Hagerman, R.J. The fragile X syndrome. *Dev. Med. Child Neurol.* **1992**, *34*, 826–832. [CrossRef]
109. Ascano, M., Jr.; Mukherjee, N.; Bandaru, P.; Miller, J.B.; Nusbaum, J.D.; Corcoran, D.L.; Langlois, C.; Munschauer, M.; Dewell, S.; Hafner, M.; et al. FMRP targets distinct mRNA sequence elements to regulate protein expression. *Nature* **2012**, *492*, 382–386. [CrossRef] [PubMed]
110. Van der Aa, N.; Rooms, L.; Vandeweyer, G.; van den Ende, J.; Reyniers, E.; Fichera, M.; Romano, C.; Delle Chiaie, B.; Mortier, G.; Menten, B.; et al. Fourteen new cases contribute to the characterization of the 7q11.23 microduplication syndrome. *Eur. J. Med Genet.* **2009**, *52*, 94–100. [CrossRef] [PubMed]
111. Roy, A.L. Biochemistry and biology of the inducible multifunctional transcription factor TFII-I: 10 years later. *Gene* **2012**, *492*, 32–41. [CrossRef] [PubMed]
112. Mervis, C.B.; Dida, J.; Lam, E.; Crawford-Zelli, N.A.; Young, E.J.; Henderson, D.R.; Onay, T.; Morris, C.A.; Woodruff-Borden, J.; Yeomans, J.; et al. Duplication of GTF2I results in separation anxiety in mice and humans. *Am. J. Hum. Genet.* **2012**, *90*, 1064–1070. [CrossRef]
113. Kajihara, R.; Numakawa, T.; Odaka, H.; Yaginuma, Y.; Fusaki, N.; Okumiya, T.; Furuya, H.; Inui, S.; Era, T. Novel Drug Candidates Improve Ganglioside Accumulation and Neural Dysfunction in GM1 Gangliosidosis Models with Autophagy Activation. *Stem Cell Rep.* **2020**, *14*, 909–923. [CrossRef] [PubMed]
114. Ruillier, V.; Tournois, J.; Boissart, C.; Lasbareilles, M.; Mahe, G.; Chatrousse, L.; Cailleret, M.; Peschanski, M.; Benchoua, A. Rescuing compounds for Lesch-Nyhan disease identified using stem cell-based phenotypic screening. *JCI Insight* **2020**, *5*, e132094. [CrossRef] [PubMed]
115. Sandhoff, K.; Harzer, K. Gangliosides and gangliosidoses: Principles of molecular and metabolic pathogenesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **2013**, *33*, 10195–10208. [CrossRef]
116. Lesch, M.; Nyhan, W.L. A Familial Disorder of Uric Acid Metabolism and Central Nervous System Function. *Am. J. Med.* **1964**, *36*, 561–570. [CrossRef]
117. Jinnah, H.A.; Visser, J.E.; Harris, J.C.; Verdu, A.; Larovere, L.; Ceballos-Picot, I.; Gonzalez-Alegre, P.; Neychev, V.; Torres, R.J.; Dulac, O.; et al. Delineation of the motor disorder of Lesch-Nyhan disease. *Brain A J. Neurol.* **2006**, *129*, 1201–1217. [CrossRef]
118. Jinnah, H.A.; De Gregorio, L.; Harris, J.C.; Nyhan, W.L.; O'Neill, J.P. The spectrum of inherited mutations causing HPRT deficiency: 75 new cases and a review of 196 previously reported cases. *Mutat. Res.* **2000**, *463*, 309–326. [CrossRef]
119. Allsop, J.; Watts, R.W. Activities of amidophosphoribosyltransferase and purine phosphoribosyltransferases in developing rat brain. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1980**, *122A*, 361–366. [CrossRef]
120. Glick, N. Dramatic reduction in self-injury in Lesch-Nyhan disease following S-adenosylmethionine administration. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2006**, *29*, 687. [CrossRef]
121. Dolcetta, D.; Parmigiani, P.; Salmaso, L.; Bernardelle, R.; Cesari, U.; Andrighetto, G.; Baschirotto, G.; Nyhan, W.L.; Hladnik, U. Quantitative evaluation of the clinical effects of S-adenosylmethionine on mood and behavior in Lesch-Nyhan patients. *NucleosidesNucleotides Nucleic Acids* **2013**, *32*, 174–188. [CrossRef]
122. Chen, B.C.; Balasubramaniam, S.; McGown, I.N.; O'Neill, J.P.; Chng, G.S.; Keng, W.T.; Ngu, L.H.; Duley, J.A. Treatment of Lesch-Nyhan disease with S-adenosylmethionine: Experience with five young Malaysians, including a girl. *Brain Dev.* **2014**, *36*, 593–600. [CrossRef]
123. Lauber, M.; Plecko, B.; Pfiffner, M.; Nuoffer, J.M.; Haberle, J. The Effect of S-Adenosylmethionine on Self-Mutilation in a Patient with Lesch-Nyhan Disease. *JIMD Rep.* **2017**, *32*, 51–57. [CrossRef] [PubMed]
124. Momosaki, K.; Kido, J.; Matsumoto, S.; Taniguchi, A.; Akiyama, T.; Sawada, T.; Ozasa, S.; Nakamura, K. The Effect of S-Adenosylmethionine Treatment on Neurobehavioral Phenotypes in Lesch-Nyhan Disease: A Case Report. *Case Rep. Neurol.* **2019**, *11*, 256–264. [CrossRef] [PubMed]
125. Negraes, P.D.; Trujillo, C.A.; Yu, N.K.; Wu, W.; Yao, H.; Liang, N.; Lautz, J.D.; Kwok, E.; McClatchy, D.; Diedrich, J.; et al. Altered network and rescue of human neurons derived from individuals with early-onset genetic epilepsy. *Mol. Psychiatry* **2021**. [CrossRef]
126. Olson, H.E.; Demarest, S.T.; Pestana-Knight, E.M.; Swanson, L.C.; Iqbal, S.; Lal, D.; Leonard, H.; Cross, J.H.; Devinsky, O.; Benke, T.A. Cyclin-Dependent Kinase-Like 5 Deficiency Disorder: Clinical Review. *Pediatric Neurol.* **2019**, *97*, 18–25. [CrossRef] [PubMed]
127. Darville, H.; Poulet, A.; Rodet-Amsellem, F.; Chatrousse, L.; Pernelle, J.; Boissart, C.; Heron, D.; Nava, C.; Perrier, A.; Jarrige, M.; et al. Human Pluripotent Stem Cell-derived Cortical Neurons for High Throughput Medication Screening in Autism: A Proof of Concept Study in SHANK3 Haploinsufficiency Syndrome. *EBioMedicine* **2016**, *9*, 293–305. [CrossRef]

128. Costales, J.L.; Kolevzon, A. Phelan-McDermid Syndrome and SHANK3: Implications for Treatment. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. NeuroTherapeutics* **2015**, *12*, 620–630. [CrossRef]
129. Durand, C.M.; Betancur, C.; Boeckers, T.M.; Bockmann, J.; Chaste, P.; Fauchereau, F.; Nygren, G.; Rastam, M.; Gillberg, I.C.; Anckarsater, H.; et al. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat. Genet.* **2007**, *39*, 25–27. [CrossRef]
130. Leblond, C.S.; Nava, C.; Polge, A.; Gauthier, J.; Huguet, G.; Lumbroso, S.; Giuliano, F.; Stordeur, C.; Depienne, C.; Mouzat, K.; et al. Meta-analysis of SHANK Mutations in Autism Spectrum Disorders: A gradient of severity in cognitive impairments. *PLoS Genet.* **2014**, *10*, e1004580. [CrossRef]
131. Boeckers, T.M.; Bockmann, J.; Kreutz, M.R.; Gundelfinger, E.D. ProSAP/Shank proteins—a family of higher order organizing molecules of the postsynaptic density with an emerging role in human neurological disease. *J. Neurochem.* **2002**, *81*, 903–910. [CrossRef]
132. Shcheglovitov, A.; Shcheglovitova, O.; Yazawa, M.; Portmann, T.; Shu, R.; Sebastiano, V.; Krawisz, A.; Froehlich, W.; Bernstein, J.A.; Hallmayer, J.F.; et al. SHANK3 and IGF1 restore synaptic deficits in neurons from 22q13 deletion syndrome patients. *Nature* **2013**, *503*, 267–271. [CrossRef]
133. Dugger, B.N.; Dickson, D.W. Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2017**, *9*. [CrossRef] [PubMed]
134. Kovacs, G.G. Concepts and classification of neurodegenerative diseases. *Handb. Clin. Neurol.* **2017**, *145*, 301–307. [CrossRef]
135. Borenstein, A.R.; Copenhaver, C.I.; Mortimer, J.A. Early-life risk factors for Alzheimer disease. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* **2006**, *20*, 63–72. [CrossRef] [PubMed]
136. Selkoe, D.J.; American College of Physicians; American Physiological Society. Alzheimer disease: Mechanistic understanding predicts novel therapies. *Ann. Intern. Med.* **2004**, *140*, 627–638. [CrossRef] [PubMed]
137. Polanco, J.C.; Li, C.; Bodea, L.G.; Martinez-Marmol, R.; Meunier, F.A.; Gotz, J. Amyloid-beta and tau complexity—towards improved biomarkers and targeted therapies. *Nat. Rev. Neurol.* **2018**, *14*, 22–39. [CrossRef]
138. Wang, Y.; Mandelkow, E. Tau in physiology and pathology. *Nat. Rev. Neurosci.* **2016**, *17*, 5–21. [CrossRef]
139. Kondo, T.; Asai, M.; Tsukita, K.; Kutoku, Y.; Ohsawa, Y.; Sunada, Y.; Imamura, K.; Egawa, N.; Yahata, N.; Okita, K.; et al. Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular Abeta and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell* **2013**, *12*, 487–496. [CrossRef]
140. Kimura, J.; Shimizu, K.; Kajima, K.; Yokosuka, A.; Mimaki, Y.; Oku, N.; Ohizumi, Y. Nobiletin Reduces Intracellular and Extracellular beta-Amyloid in iPS Cell-Derived Alzheimer's Disease Model Neurons. *Biol. Pharm. Bull.* **2018**, *41*, 451–457. [CrossRef]
141. Wang, C.; Najm, R.; Xu, Q.; Jeong, D.E.; Walker, D.; Balestra, M.E.; Yoon, S.Y.; Yuan, H.; Li, G.; Miller, Z.A.; et al. Gain of toxic apolipoprotein E4 effects in human iPSC-derived neurons is ameliorated by a small-molecule structure corrector. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 647–657. [CrossRef]
142. Young, J.E.; Fong, L.K.; Frankowski, H.; Petsko, G.A.; Small, S.A.; Goldstein, L.S.B. Stabilizing the Retromer Complex in a Human Stem Cell Model of Alzheimer's Disease Reduces TAU Phosphorylation Independently of Amyloid Precursor Protein. *Stem Cell Rep.* **2018**, *10*, 1046–1058. [CrossRef] [PubMed]
143. Lo Giudice, M.; Mihalik, B.; Turi, Z.; Dinnyes, A.; Kobolak, J. Calcilytic NPS 2143 Reduces Amyloid Secretion and Increases sAbetaPPalpha Release from PSEN1 Mutant iPSC-Derived Neurons. *J. Alzheimers Dis. JAD* **2019**, *72*, 885–899. [CrossRef] [PubMed]
144. Ochalek, A.; Mihalik, B.; Avci, H.X.; Chandrasekaran, A.; Teglasi, A.; Bock, I.; Giudice, M.L.; Tancos, Z.; Molnar, K.; Laszlo, L.; et al. Neurons derived from sporadic Alzheimer's disease iPSCs reveal elevated TAU hyperphosphorylation, increased amyloid levels, and GSK3B activation. *Alzheimers Res. Ther.* **2017**, *9*, 90. [CrossRef]
145. Xu, X.; Lei, Y.; Luo, J.; Wang, J.; Zhang, S.; Yang, X.J.; Sun, M.; Nuwaysir, E.; Fan, G.; Zhao, J.; et al. Prevention of beta-amyloid induced toxicity in human iPS cell-derived neurons by inhibition of Cyclin-dependent kinases and associated cell cycle events. *Stem Cell Res.* **2013**, *10*, 213–227. [CrossRef]
146. McLaren, D.; Gorba, T.; Marguerie de Rotrou, A.; Pillai, G.; Chappell, C.; Stacey, A.; Lingard, S.; Falk, A.; Smith, A.; Koch, P.; et al. Automated large-scale culture and medium-throughput chemical screen for modulators of proliferation and viability of human induced pluripotent stem cell-derived neuroepithelial-like stem cells. *J. Biomol. Screen.* **2013**, *18*, 258–268. [CrossRef]
147. Wang, C.; Ward, M.E.; Chen, R.; Liu, K.; Tracy, T.E.; Chen, X.; Xie, M.; Sohn, P.D.; Ludwig, C.; Meyer-Franke, A.; et al. Scalable Production of iPSC-Derived Human Neurons to Identify Tau-Lowering Compounds by High-Content Screening. *Stem Cell Rep.* **2017**, *9*, 1221–1233. [CrossRef]
148. van der Kant, R.; Langness, V.F.; Herrera, C.M.; Williams, D.A.; Fong, L.K.; Leestemaker, Y.; Steenvoorden, E.; Rynearson, K.D.; Brouwers, J.F.; Helms, J.B.; et al. Cholesterol Metabolism Is a Druggable Axis that Independently Regulates Tau and Amyloid-beta in iPSC-Derived Alzheimer's Disease Neurons. *Cell Stem Cell* **2019**, *24*, 363–375. [CrossRef] [PubMed]
149. Baker, M.G.; Graham, L. The journey: Parkinson's disease. *BMJ* **2004**, *329*, 611–614. [CrossRef]
150. Gonera, E.G.; van't Hof, M.; Berger, H.J.; van Weel, C.; Horstink, M.W. Symptoms and duration of the prodromal phase in Parkinson's disease. *Mov. Disord. Off. J. Mov. Disord. Soc.* **1997**, *12*, 871–876. [CrossRef] [PubMed]
151. Fearnley, J.M.; Lees, A.J. Ageing and Parkinson's disease: Substantia nigra regional selectivity. *Brain A J. Neurol.* **1991**, *114*, 2283–2301. [CrossRef]

152. Chung, C.Y.; Khurana, V.; Auluck, P.K.; Tardiff, D.F.; Mazzulli, J.R.; Soldner, F.; Baru, V.; Lou, Y.; Freyzon, Y.; Cho, S.; et al. Identification and rescue of alpha-synuclein toxicity in Parkinson patient-derived neurons. *Science* **2013**, *342*, 983–987. [CrossRef]
153. Mittal, S.; Bjornevik, K.; Im, D.S.; Flierl, A.; Dong, X.; Locascio, J.J.; Abo, K.M.; Long, E.; Jin, M.; Xu, B.; et al. beta2-Adrenoreceptor is a regulator of the alpha-synuclein gene driving risk of Parkinson's disease. *Science* **2017**, *357*, 891–898. [CrossRef]
154. Oh, Y. Patient-specific pluripotent stem cell-based Parkinson's disease models showing endogenous alpha-synuclein aggregation. *BMB Rep.* **2019**, *52*, 349–359. [CrossRef]
155. Dehay, B.; Bourdenx, M.; Gorry, P.; Przedborski, S.; Vila, M.; Hunot, S.; Singleton, A.; Olanow, C.W.; Merchant, K.M.; Bezard, E.; et al. Targeting alpha-synuclein for treatment of Parkinson's disease: Mechanistic and therapeutic considerations. *Lancet Neurol.* **2015**, *14*, 855–866. [CrossRef]
156. Burbulla, L.F.; Song, P.; Mazzulli, J.R.; Zampese, E.; Wong, Y.C.; Jeon, S.; Santos, D.P.; Blanz, J.; Obermaier, C.D.; Strojny, C.; et al. Dopamine oxidation mediates mitochondrial and lysosomal dysfunction in Parkinson's disease. *Science* **2017**, *357*, 1255–1261. [CrossRef] [PubMed]
157. Little, D.; Luft, C.; Mosaku, O.; Lorvellec, M.; Yao, Z.; Paillusson, S.; Kriston-Vizi, J.; Gandhi, S.; Abramov, A.Y.; Ketteler, R.; et al. A single cell high content assay detects mitochondrial dysfunction in iPSC-derived neurons with mutations in SNCA. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 9033. [CrossRef]
158. Kondo, T.; Imamura, K.; Funayama, M.; Tsukita, K.; Miyake, M.; Ohta, A.; Woltjen, K.; Nakagawa, M.; Asada, T.; Arai, T.; et al. iPSC-Based Compound Screening and In Vitro Trials Identify a Synergistic Anti-amyloid beta Combination for Alzheimer's Disease. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 2304–2312. [CrossRef] [PubMed]
159. Allen, S.J.; Watson, J.J.; Shoemark, D.K.; Barua, N.U.; Patel, N.K. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol. Ther.* **2013**, *138*, 155–175. [CrossRef]
160. Tanila, H. The role of BDNF in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* **2017**, *97*, 114–118. [CrossRef] [PubMed]
161. Palasz, E.; Wysocka, A.; Gasiorowska, A.; Chalimoniuk, M.; Niewiadomski, W.; Niewiadomska, G. BDNF as a Promising Therapeutic Agent in Parkinson's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1170. [CrossRef] [PubMed]
162. Charbord, J.; Poydenot, P.; Bonnefond, C.; Feyeux, M.; Casagrande, F.; Brinon, B.; Francelle, L.; Auregan, G.; Guillermier, M.; Cailleret, M.; et al. High throughput screening for inhibitors of REST in neural derivatives of human embryonic stem cells reveals a chemical compound that promotes expression of neuronal genes. *Stem Cells* **2013**, *31*, 1816–1828. [CrossRef]
163. Phatnani, H.; Maniatis, T. Astrocytes in neurodegenerative disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2015**, *7*. [CrossRef]
164. Lin, M.T.; Beal, M.F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* **2006**, *443*, 787–795. [CrossRef] [PubMed]
165. Thorne, N.; Malik, N.; Shah, S.; Zhao, J.; Class, B.; Aguisanda, F.; Southall, N.; Xia, M.; McKew, J.C.; Rao, M.; et al. High-Throughput Phenotypic Screening of Human Astrocytes to Identify Compounds That Protect Against Oxidative Stress. *Stem Cells Transl. Med.* **2016**, *5*, 613–627. [CrossRef]
166. Ransohoff, R.M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science* **2016**, *353*, 777–783. [CrossRef]
167. Hoing, S.; Rudhard, Y.; Reinhardt, P.; Glatza, M.; Stehling, M.; Wu, G.; Peiker, C.; Bocker, A.; Parga, J.A.; Bunk, E.; et al. Discovery of inhibitors of microglial neurotoxicity acting through multiple mechanisms using a stem-cell-based phenotypic assay. *Cell Stem Cell* **2012**, *11*, 620–632. [CrossRef] [PubMed]
168. Reinhardt, L.; Kordes, S.; Reinhardt, P.; Glatza, M.; Baumann, M.; Drexler, H.C.A.; Menninger, S.; Zischinsky, G.; Eickhoff, J.; Frob, C.; et al. Dual Inhibition of GSK3beta and CDK5 Protects the Cytoskeleton of Neurons from Neuroinflammatory-Mediated Degeneration In Vitro and In Vivo. *Stem Cell Rep.* **2019**, *12*, 502–517. [CrossRef]
169. Haenseler, W.; Sansom, S.N.; Buchrieser, J.; Newey, S.E.; Moore, C.S.; Nicholls, F.J.; Chintawar, S.; Schnell, C.; Antel, J.P.; Allen, N.D.; et al. A Highly Efficient Human Pluripotent Stem Cell Microglia Model Displays a Neuronal-Co-culture-Specific Expression Profile and Inflammatory Response. *Stem Cell Rep.* **2017**, *8*, 1727–1742. [CrossRef]
170. Miller, J.D.; Ganat, Y.M.; Kishinevsky, S.; Bowman, R.L.; Liu, B.; Tu, E.Y.; Mandal, P.K.; Vera, E.; Shim, J.W.; Kriks, S.; et al. Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. *Cell Stem Cell* **2013**, *13*, 691–705. [CrossRef]
171. Steel, Z.; Marnane, C.; Iranpour, C.; Chey, T.; Jackson, J.W.; Patel, V.; Silove, D. The global prevalence of common mental disorders: A systematic review and meta-analysis 1980-2013. *Int. J. Epidemiol.* **2014**, *43*, 476–493. [CrossRef]
172. Vigo, D.; Thornicroft, G.; Atun, R. Estimating the true global burden of mental illness. *Lancet. Psychiatry* **2016**, *3*, 171–178. [CrossRef]
173. Villanueva, R. Neurobiology of major depressive disorder. *Neural Plast.* **2013**, *2013*, 873278. [CrossRef]
174. Meyer, J.H.; Ginovart, N.; Boovariwala, A.; Sagrati, S.; Hussey, D.; Garcia, A.; Young, T.; Praschak-Rieder, N.; Wilson, A.A.; Houle, S. Elevated monoamine oxidase a levels in the brain: An explanation for the monoamine imbalance of major depression. *Arch. Gen. Psychiatry* **2006**, *63*, 1209–1216. [CrossRef] [PubMed]
175. Sahay, A.; Hen, R. Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nat. Neurosci.* **2007**, *10*, 1110–1115. [CrossRef] [PubMed]
176. Kempermann, G.; Krebs, J.; Fabel, K. The contribution of failing adult hippocampal neurogenesis to psychiatric disorders. *Curr. Opin. Psychiatry* **2008**, *21*, 290–295. [CrossRef] [PubMed]
177. Lewis, D.A.; Lieberman, J.A. Catching up on schizophrenia: Natural history and neurobiology. *Neuron* **2000**, *28*, 325–334. [CrossRef]

178. Kessler, R.C.; Birnbaum, H.; Demler, O.; Falloon, I.R.; Gagnon, E.; Guyer, M.; Howes, M.J.; Kendler, K.S.; Shi, L.; Walters, E.; et al. The prevalence and correlates of nonaffective psychosis in the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *Biol. Psychiatry* **2005**, *58*, 668–676. [CrossRef] [PubMed]
179. Insel, T.R. Rethinking schizophrenia. *Nature* **2010**, *468*, 187–193. [CrossRef]
180. Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study, C. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nat. Genet.* **2011**, *43*, 969–976. [CrossRef]
181. Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics, C. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature* **2014**, *511*, 421–427. [CrossRef]
182. Goodwin, F.K.; Ghaemi, S.N. The course of bipolar disorder and the nature of agitated depression. *Am. J. Psychiatry* **2003**, *160*, 2077–2079. [CrossRef]
183. Menzies, F.M.; Fleming, A.; Rubinsztein, D.C. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* **2015**, *16*, 345–357. [CrossRef]
184. Schneider, M.R.; DelBello, M.P.; McNamara, R.K.; Strakowski, S.M.; Adler, C.M. Neuroprogression in bipolar disorder. *Bipolar Disord.* **2012**, *14*, 356–374. [CrossRef] [PubMed]
185. Watmuff, B.; Liu, B.; Karmacharya, R. Stem cell-derived neurons in the development of targeted treatment for schizophrenia and bipolar disorder. *Pharmacogenomics* **2017**, *18*, 471–479. [CrossRef]
186. Santarelli, L.; Saxe, M.; Gross, C.; Surget, A.; Battaglia, F.; Dulawa, S.; Weisstaub, N.; Lee, J.; Duman, R.; Arancio, O.; et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* **2003**, *301*, 805–809. [CrossRef]
187. Surget, A.; Saxe, M.; Leman, S.; Ibarguen-Vargas, Y.; Chalon, S.; Griebel, G.; Hen, R.; Belzung, C. Drug-dependent requirement of hippocampal neurogenesis in a model of depression and of antidepressant reversal. *Biol. Psychiatry* **2008**, *64*, 293–301. [CrossRef] [PubMed]
188. Sheline, Y.I. Neuroimaging studies of mood disorder effects on the brain. *Biol. Psychiatry* **2003**, *54*, 338–352. [CrossRef]
189. Steen, R.G.; Mull, C.; McClure, R.; Hamer, R.M.; Lieberman, J.A. Brain volume in first-episode schizophrenia: Systematic review and meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Br. J. Psychiatry J. Ment. Sci.* **2006**, *188*, 510–518. [CrossRef]
190. Bearden, C.E.; Thompson, P.M.; Dalwani, M.; Hayashi, K.M.; Lee, A.D.; Nicoletti, M.; Trakhtenbroit, M.; Glahn, D.C.; Brambilla, P.; Sassi, R.B.; et al. Greater cortical gray matter density in lithium-treated patients with bipolar disorder. *Biol. Psychiatry* **2007**, *62*, 7–16. [CrossRef] [PubMed]
191. Yucel, K.; Taylor, V.H.; McKinnon, M.C.; Macdonald, K.; Alda, M.; Young, L.T.; MacQueen, G.M. Bilateral hippocampal volume increase in patients with bipolar disorder and short-term lithium treatment. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* **2008**, *33*, 361–367. [CrossRef] [PubMed]
192. Giakoumatos, C.I.; Nanda, P.; Mathew, I.T.; Tandon, N.; Shah, J.; Bishop, J.R.; Clementz, B.A.; Pearlson, G.D.; Sweeney, J.A.; Tamminga, C.A.; et al. Effects of lithium on cortical thickness and hippocampal subfield volumes in psychotic bipolar disorder. *J. Psychiatr. Res.* **2015**, *61*, 180–187. [CrossRef]
193. Tamminga, C.A.; Stan, A.D.; Wagner, A.D. The hippocampal formation in schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* **2010**, *167*, 1178–1193. [CrossRef] [PubMed]
194. Mathew, I.; Gardin, T.M.; Tandon, N.; Eack, S.; Francis, A.N.; Seidman, L.J.; Clementz, B.; Pearlson, G.D.; Sweeney, J.A.; Tamminga, C.A.; et al. Medial temporal lobe structures and hippocampal subfields in psychotic disorders: Findings from the Bipolar-Schizophrenia Network on Intermediate Phenotypes (B-SNIP) study. *JAMA Psychiatry* **2014**, *71*, 769–777. [CrossRef] [PubMed]
195. Vadodaria, K.C.; Ji, Y.; Skime, M.; Paquola, A.C.; Nelson, T.; Hall-Flavin, D.; Heard, K.J.; Fredlender, C.; Deng, Y.; Elkins, J.; et al. Altered serotonergic circuitry in SSRI-resistant major depressive disorder patient-derived neurons. *Mol. Psychiatry* **2019**, *24*, 808–818. [CrossRef]
196. Vadodaria, K.C.; Ji, Y.; Skime, M.; Paquola, A.; Nelson, T.; Hall-Flavin, D.; Fredlender, C.; Heard, K.J.; Deng, Y.; Le, A.T.; et al. Serotonin-induced hyperactivity in SSRI-resistant major depressive disorder patient-derived neurons. *Mol. Psychiatry* **2019**, *24*, 795–807. [CrossRef]
197. Viguera, A.C.; Tondo, L.; Baldessarini, R.J. Sex differences in response to lithium treatment. *Am. J. Psychiatry* **2000**, *157*, 1509–1511. [CrossRef]
198. Tohen, M.; Greil, W.; Calabrese, J.R.; Sachs, G.S.; Yatham, L.N.; Oerlinghausen, B.M.; Koukopoulos, A.; Cassano, G.B.; Grunze, H.; Licht, R.W.; et al. Olanzapine versus lithium in the maintenance treatment of bipolar disorder: A 12-month, randomized, double-blind, controlled clinical trial. *Am. J. Psychiatry* **2005**, *162*, 1281–1290. [CrossRef]
199. Mertens, J.; Wang, Q.W.; Kim, Y.; Yu, D.X.; Pham, S.; Yang, B.; Zheng, Y.; Diffenderfer, K.E.; Zhang, J.; Soltani, S.; et al. Differential responses to lithium in hyperexcitable neurons from patients with bipolar disorder. *Nature* **2015**, *527*, 95–99. [CrossRef]
200. Santos, R.; Linker, S.B.; Stern, S.; Mendes, A.P.D.; Shokhirev, M.N.; Erikson, G.; Randolph-Moore, L.; Racha, V.; Kim, Y.; Kelsoe, J.R.; et al. Deficient LEF1 expression is associated with lithium resistance and hyperexcitability in neurons derived from bipolar disorder patients. *Mol. Psychiatry* **2021**, *26*, 2440–2456. [CrossRef]
201. Zhao, W.N.; Cheng, C.; Theriault, K.M.; Sheridan, S.D.; Tsai, L.H.; Haggarty, S.J. A high-throughput screen for Wnt/beta-catenin signaling pathway modulators in human iPSC-derived neural progenitors. *J. Biomol. Screen.* **2012**, *17*, 1252–1263. [CrossRef] [PubMed]

202. Durens, M.; Nestor, J.; Williams, M.; Herold, K.; Niescier, R.F.; Lunden, J.W.; Phillips, A.W.; Lin, Y.C.; Dykxhoorn, D.M.; Nestor, M.W. High-throughput screening of human induced pluripotent stem cell-derived brain organoids. *J. Neurosci. Methods* **2020**, *335*, 108627. [CrossRef]
203. Hendriks, D.; Clevers, H.; Artegiani, B. CRISPR-Cas Tools and Their Application in Genetic Engineering of Human Stem Cells and Organoids. *Cell Stem Cell* **2020**, *27*, 705–731. [CrossRef]
204. Nishiga, M.; Qi, L.S.; Wu, J.C. CRISPRi/a Screening with Human iPSCs. *Methods Mol. Biol.* **2021**, *2320*, 261–281. [CrossRef] [PubMed]
205. Malandraki-Miller, S.; Riley, P.R. Use of artificial intelligence to enhance phenotypic drug discovery. *Drug Discov. Today* **2021**, *26*, 887–901. [CrossRef] [PubMed]

Chapitre 3 : Implication des neurones DA dans une maladie rare : la maladie de Lesch-Nyhan

1. La maladie de Lesch-Nyhan (MLN)

1.1. Découverte de la maladie de Lesch-Nyhan

La maladie de Lesch-Nyhan, ou MLN, est une pathologie rare métabolique et neurodéveloppementale décrite pour la première fois par Michael Lesch et William Nyhan en 1964 (Lesch & Nyhan, 1964). Ils ont observé chez deux frères un syndrome regroupant un ensemble de symptômes spécifiques associant des troubles neurologiques conduisant à un retard mental ainsi que des troubles comportementaux prenant la forme d'automutilations par morsures compulsives. Associés à ses troubles neurologiques, les patients présentaient également des troubles moteurs : l'association d'une chorée (mouvements saccadés et involontaires) et d'une athétose (répétition d'un mouvement de façon lente et irrégulière). Un dernier symptôme a été décrit : la présence de cristaux dans les urines signe d'une surproduction en acide urique (SAU) ou hyperuricémie.

1.2. Description clinique de la maladie

Epidémiologie

La MLN est une pathologie rare de prévalence 1-9/1 000 000 d'après le site Orphanet (Source : Syndrome de Lesch Nyhan - Orphanet, https://www.orpha.net) ce qui représente 1/380 000 et 1/235 000 naissances vivantes respectivement au Canada et en Espagne (Torres & Puig, 2007). En France, on compte une centaine de cas enregistrés pour la MLN (Source : https://www.lesch-nyhan-action.org/maladie).

Symptômes généraux

Les patients atteints de la MLN présentent une association de symptômes regroupant des troubles métaboliques, moteurs et neurologiques, dont certains ont déjà été évoqués ci-dessus. Parmi les symptômes métaboliques on retrouve la SAU. La SAU peut entraîner de la goutte avec une accumulation de microcristaux au niveau des articulations (tophus) provoquant une inflammation, une hyperuricémie, des néphropathies pouvant aller jusqu'à

l'insuffisance rénale dans certains cas (Fu et al., 2014; Madeo et al., 2019; Torres & Puig, 2007).

Associées aux perturbations du métabolisme de l'acide urique on retrouve également des manifestations motrices pouvant suggérer une implication des structures cérébrales impliquées dans le contrôle moteur dont les ganglions de la base (Visser et al., 2000). Les patients présentent des troubles de la posture et des difficultés au niveau de la démarche. On retrouve également des manifestations motrices pyramidales et extra-pyramidales telles que la chorée-athétose, du ballisme, de la spasticité, des contractions cloniques, des dystonies plus ou moins sévères, focales ou généralisées ou encore des troubles de la déglutition (H. A. Jinnah et al., 2010; Torres & Puig, 2007; Visser et al., 2000).

En plus des troubles moteurs, la maladie entraîne des troubles neurologiques. On peut les séparer en deux catégories : les troubles cognitifs et les troubles comportementaux. Certains patients présentent des troubles du sommeil, de l'attention et des difficultés d'apprentissage. Les patients présenteraient également un QI normal ou inférieur à la moyenne en fonction de la forme de la pathologie (H. A. Jinnah et al., 2010; Schretlen et al., 2001). Toutefois, en fonction de la sévérité des symptômes comportementaux des patients pouvant rendre difficile l'évaluation de ce score, celui-ci a parfois été discuté (Schretlen et al., 2001). En plus des troubles cognitifs, on peut observer des comportements impulsifs ou compulsifs conduisant à des crises d'automutilation par morsures (H. A. Jinnah et al., 2006; Madeo et al., 2019; Torres & Puig, 2007; Visser et al., 2000). En fonction de la sévérité de la pathologie les patients présentent certains, ou, tous les symptômes décrits ci-dessus.

1.3. Cause de la pathologie : mutation du gène *HPRT1*

On sait aujourd'hui que l'origine de la MLN (OMIM#300322) conduisant à la surproduction d'acide urique est liée à un déficit total de l'enzyme hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase ou HGPRT causé par la mutation du gène *HPRT1* (hypoxanthine phosphoribosyltransférase 1) (Torres & Puig, 2007).

L'HGPRT est une enzyme clé du métabolisme des purines, fortement conservée chez les eucaryotes (Keebaugh et al., 2007), impliquée dans le recyclage des purines (Figure 23). Cette enzyme est codée par le gène *HPRT1* (OMIM#308000), La protéine HGPRT va permettre le recyclage des purines selon deux réactions : la conversion de l'hypoxanthine en inosine

monophosphate (IMP) et de la guanine en guanosine monophosphate (GMP), via l'utilisation du phosphoribosylpyrophosphate (PRPP) (Figure 23). Le gène *HPRT1* est situé sur le chromosome X, précisément sur le bras long en Xq26 (Fu et al., 2014; Pai et al., 1980; Torres & Puig, 2007). La structure du gène est composée de 9 exons et de 8 introns, sa transcription va donner un ARN (acide ribonucléique) messager de 1,6 kb et par la suite une protéine de 24,6 kDa (Fu et al., 2014; Jolly et al., 1983; Keebaugh et al., 2007).

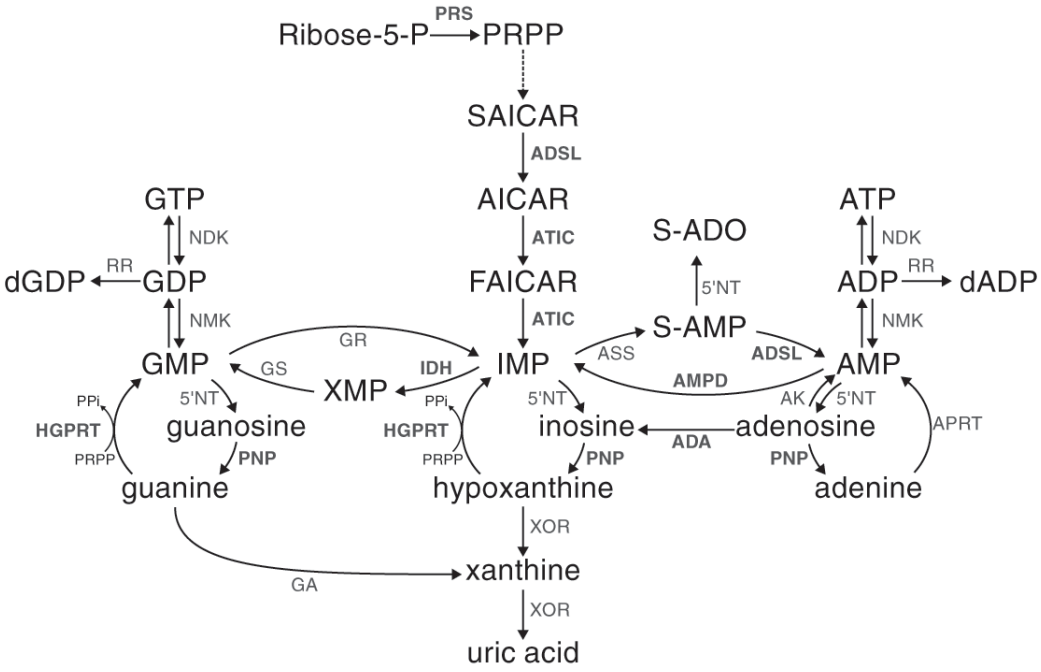


Figure 23 : Métabolisme des purines et recyclage par l'HGPRT.

(Source : Visser & Jinnah, 2020).

1.4. Les différentes formes de la maladie de Lesch-Nyhan

La forme la plus sévère de la maladie de Lesch-Nyhan est causée par un déficit total ou partiel de l'enzyme HGPRT avec une activité de celle-ci inférieure à 1,5%. D'autres formes de la maladie de Lesch-Nyhan, n'entrainant pas la perte totale de l'enzyme mais un déficit partiel en HGPRT, ont été décrites. En fonction de l'activité résiduelle de l'enzyme et des symptômes associés, ces formes ont été séparées en deux groupes : les hyperuricémies liées à l'HPRT sans manifestations neurologiques, ou HRH (OMIM#300323), également appelées syndrome de Kelley-Seegmiller (avec une activité résiduelle supérieure à 10%) et les hyperuricémies

associées à des troubles neurologiques et une hyperuricémie ou HND (Figure 24). On regroupe ces formes sous le terme de variants Lesch-Nyhan ou VLN (Fu et al., 2014; Kelley et al., 1967; Torres & Puig, 2007). L'apparition et le type des premiers symptômes de la maladie diffèrent selon le groupe, MLN ou VLN, auquel appartiennent les patients. En fonction de l'activité résiduelle de l'enzyme, la perte du recyclage des purines est plus ou moins compensée par l'activation de la voie de synthèse de novo. Toutefois, celle-ci ne permet pas dans tous les cas de la compenser intégralement (Fu et al., 2014; H. A. Jinnah et al., 2010; Madeo et al., 2019).

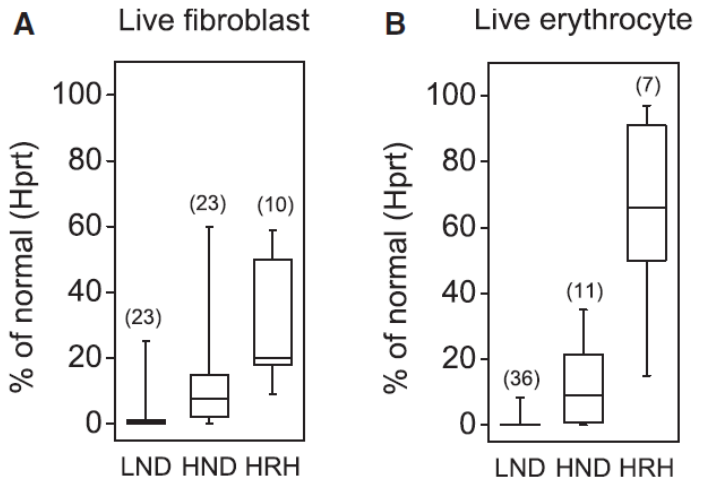


Figure 24 : Corrélation entre le pourcentage résiduel en enzyme HGPRT et le phénotype clinique de la MLN.

Pourcentage de l'enzyme HGPRT (Hprt sur les boxplots) en fonction de la sévérité clinique dans les cellules de patients. (A) Mesure du taux de l'enzyme dans les fibroblastes de 56 patients. (B) Mesure du taux de l'enzyme dans les érythrocytes de 54 patients. (Source : Fu et al., 2014).

Il existe aujourd'hui plus de 600 mutations connues du gène *HPRT1* (Source : http://www.lesch-nyhan.org/en/research/mutations-database). Il existe donc une corrélation entre le génotype et le phénotype de la pathologie en lien avec sa sévérité (Fu et al., 2014, 2015). La figure suivante (Figure 25) représente un exemple des mutations retrouvées dans une cohorte de 85 patients français, ces travaux ont été publiés par Ceballos-Picot et al., 2015.

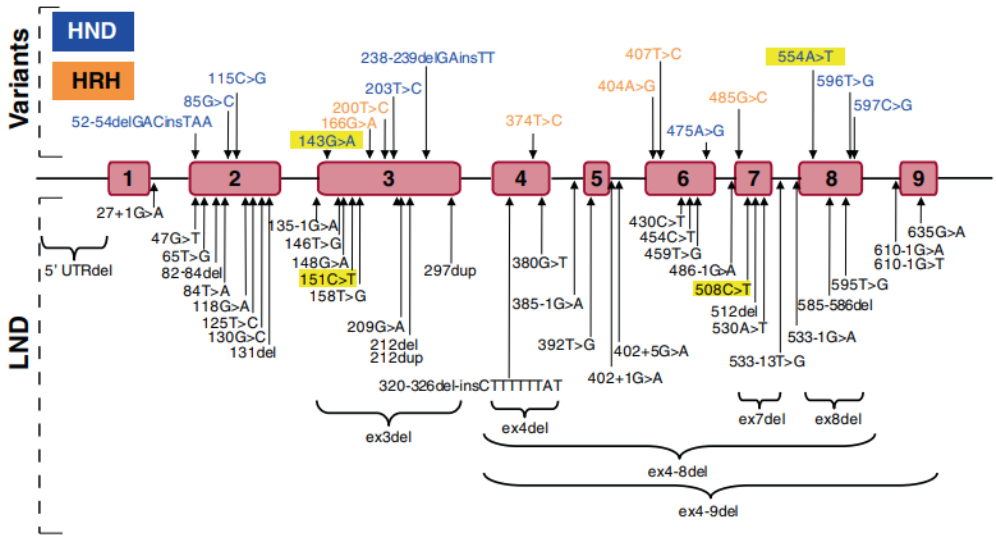


Figure 25 : Localisation et nature des mutations retrouvées dans une cohorte de 85 patients Lesch-Nyhan.

Les mutations ont été identifiées par séquençage de l'ADN pour les patients atteints de la forme MLN (en noir) et des formes HND (en bleu) et HRH (en orange). Les mutations surlignées en jaune, sont celles qui ont été identifiées dans plusieurs familles. (Source : Ceballos-Picot et al., 2015).

Dans toutes les formes de la pathologie, l'augmentation en acide urique et les manifestations rénales sont présentes. En revanche la gravité et la présence des troubles neurologiques et comportementaux varient en fonction de la mutation du patient et du groupe auquel il appartient (Figure 26). C'est le cas par exemple des automutilations compulsives par morsures retrouvées particulièrement chez les cas avec déficit complet de l'enzyme (Fu et al., 2014; Harris, 2018; H. A. Jinnah et al., 2010; Page et al., 1981; Schretlen et al., 2001, 2005; Torres & Puig, 2007).

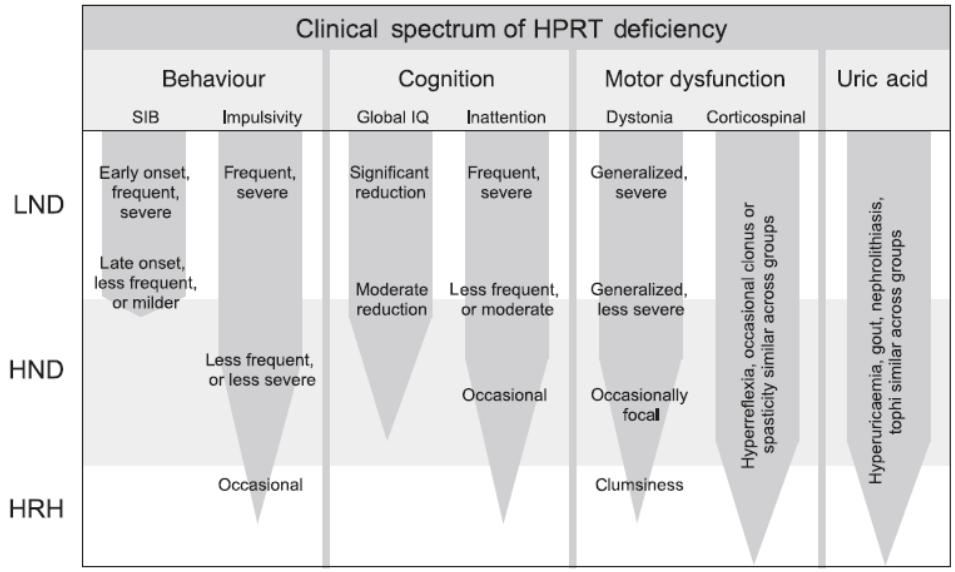


Figure 26 : Schéma du spectre clinique de la MLN.

Les patients sont séparés en trois groupes selon le déficit en HPRT : MLN et ses variants HND et HRH. Certains troubles comme l'hyperuricémie ou les troubles corticospinaux se retrouvent dans les trois groupes. D'autres, comme les troubles du comportement sont plus variables selon le groupe. (Source : H. A. Jinnah et al., 2010).

1.5. Diagnostic et prise en charge des patients MLN

Diagnostic de la pathologie

L'identification de la maladie de Lesch-Nyhan repose sur plusieurs éléments. En premier, le diagnostic est évoqué lorsque l'on retrouve des symptômes moteurs ainsi que la présence d'acide urique dans les urines chez le patient. En fonction de la sévérité de la pathologie, ses symptômes ne sont pas toujours visibles à un temps précoce et il peut y avoir un retard de diagnostic pour les formes les moins sévères. Il faut alors identifier la mutation causale par test génétique et vérifier l'absence ou la réduction de l'activité de l'HGPRT dans les cellules. Cette mesure de l'activité enzymatique est effectuée sur des cellules de patient lysées ou en culture : les érythrocytes et les fibroblastes (H. A. Jinnah et al., 2006; Torres & Puig, 2007). Si la mutation a été identifiée dans la famille, il est possible d'effectuer un diagnostic prénatal (Syndrome de Lesch Nyhan - Orphanet, https://www.orpha.net).

L'étude rapportant les analyses des données biochimiques et moléculaires d'une cohorte

de patients français qui a montré qu'une augmentation des métabolites de la voie de synthèse des purines (AICAR, ZTP, nicotinamide, acide nicotinique et succinyl-AMP) pouvaient être mesurée et dans les cellules sanguines de patient, suggère qu'ils pourraient constituer des biomarqueurs supplémentaires pour le diagnostic des différentes formes de la pathologie (Ceballos-Picot et al., 2015).

Pronostic de la maladie

La SAU contrôlée par l'allopurinol permet de préserver la fonction rénale des patients si la prise en charge est précoce et la dose adaptée pour prévenir l'apparition de lithiase xanthique (Torres et al., 2007; Torres & Puig, 2007). Des troubles d'origine respiratoire, pneumopathies et infections respiratoires, peuvent être à l'origine du décès des patients. Ils semblent en tout cas être à l'origine de plusieurs cas de mort subite et inattendue (Neychev & Jinnah, 2006). Les processus à l'origine de ces perturbations sont encore mal connus. Avec une prise en charge optimale, les patients atteints de la maladie de Lesch-Nyhan vivent en moyenne entre 20 et 40 ans. Pour les formes les plus sévères avec perturbation de la motricité et de la posture, les patients passent la majorité de leur vie en fauteuil roulant.

Traitements

Il n'existe à ce jour par de traitement curatif de la maladie de Lesch-Nyhan. La prise en charge est symptomatique et vise à améliorer les symptômes de la maladie et la qualité de vie des patients. Il n'y a pas de protocole idéal pour traiter ces patients et en fonction de la sévérité de la pathologie, les patients reçoivent une combinaison de traitement pharmacologique et de thérapie comportementale.

- Prise en charge de la SAU

Les problèmes liés à la SAU peuvent être contrôlés en majorité par administration d'allopurinol, une molécule thérapeutique classiquement utilisée dans le traitement de la goutte ou des calculs rénaux provoqués par l'excès en acide urique, le tout associé à une bonne hydratation. Une alternative à l'allopurinol est le febuxostat. L'alcalinisation des urines peut également être envisagée (H. A. Jinnah et al., 2006; Madeo et al., 2019; Torres & Puig, 2007). Pour certains cas de goutte sévère ou de lithiase persistante, des patients ont également été traités avec du rasburicase une puissante urate oxydase recombinante (Madeo et al., 2019).

- Traitements des troubles neurologiques et comportementaux utilisés actuellement

Plusieurs classes de molécules thérapeutiques sont utilisées dans le traitement des perturbations motrices (dystonies, spasticité), neurologiques ou comportementales de la maladie. On retrouve ainsi des benzodiazépines (diazépam) et ou des dérivés de l'acide γ-aminobutyrique (comme le baclofène), certains antidépresseurs et antiépileptiques (gabapentine, carbamazépine) ou encore des antipsychotiques (H. A. Jinnah et al., 2006; Madeo et al., 2019; Torres & Puig, 2007).

En plus des traitements médicamenteux, il est recommandé aux patients de la rééducation pour les troubles de la posture, de la démarche ou de la déglutition. Pour les troubles de la posture ou moteur sévères, les patients se déplacent le plus souvent en fauteuil roulant. Lors des crises compulsives, des contentions ainsi que des protections pour les mains et des protections dentaires peuvent également être conseillées (Torres & Puig, 2007).

- Les traitements abandonnés

Plusieurs pistes thérapeutiques ont été envisagées et arrêtées pour traiter les aspects neurologiques de la maladie. Pour compenser la déplétion en AMP et réapprovisionner le pool des purines, une des options envisagées à été d'administrer à des patients de l'adénine précurseur du nucléotide. L'hypothèse était que la supplémentation en adénine permettrait également de ralentir l'accélération de la voie *de novo*. Il a pu être observé une diminution de la sécrétion d'acide urique et de l'anémie mégaloblastique dans certains cas mais il n'y avait aucun effet sur les troubles neurocomportementaux (Bell et al., 2016; Benke et al., 1973; van der Zee et al., 1970).

Compte tenu des différents symptômes moteurs laissant penser à une atteinte des ganglions de la base et des nDA dans la MLN (cet aspect sera développé dans la deuxième partie du chapitre) et de la similarité de ces symptômes avec ceux retrouvés dans la maladie de Parkinson, des tests avec la L-DOPA en traitement ont été réalisés. La L-DOPA est utilisée dans le traitement de la maladie de Parkinson en combinaison avec un inhibiteur de la dopadécarboxylase. Cependant seule une amélioration partielle de la dystonie et des troubles du comportement ont été observés, et de plus, dans certains cas le traitement a même aggravé

les symptômes chez les patients traités (Bell et al., 2016; Jankovic et al., 1988; Madeo et al., 2019; Serrano et al., 2008; Visser et al., 2011).

Toujours en lien avec l'implication des nDA dans la pathologie, l'hypothèse d'une sensibilité accrue des récepteurs à la DA a été proposée. Des essais ont été réalisés chez des patients avec des molécules antagonistes des Rc D_1 et D_2, ou avec la tétrabénazine (déplète les monoamines au niveau du SNC). Cependant malgré l'amélioration dans certains cas des comportements compulsifs d'automutilation par morsure, ces traitements ont été arrêtés à cause de l'apparition d'effets indésirables sévères (Allen & Rice, 1996; Bell et al., 2016; Goldstein et al., 1985; Jankovic et al., 1988; Khasnavis, Reiner, et al., 2016; Khasnavis, Torres, et al., 2016). Des études ayant suggéré une déplétion d'un autre neurotransmetteur, la sérotonine (également abordées dans la partie suivante du chapitre), l'administration du précurseur de la sérotonine (le 5-hydroxytryptophane) a également été essayé (Bell et al., 2016; Castells et al., 1979; Ciaranello et al., 1976). Les résultats n'ont pas semblé montrer d'amélioration significative, de plus, leur durée dans le temps semblait très limitée.

- Les traitements potentiels et/ou discutés

Par rapport à l'hypothèse de l'adénosine dans la pathologie, une molécule, la S-adénosylméthionine (SAM), a été testée chez certains patients. Cette molécule impliquée dans divers processus de méthylation agirait, via sa dégradation en S-adénosylhomocystéine (SAH), en donneur d'adénosine (après dégradation de la SAH). Différents essais thérapeutiques chez des patients ont montré une amélioration intéressante des comportements compulsifs d'automutilation et de l'agressivité. La SAM s'avère être efficace pour stabiliser certaines dystonies, les troubles de l'humeur et l'anxiété. Cependant, dans certains cas l'administration de la SAM a entrainé une aggravation des troubles comportementaux. Des études supplémentaires sont encore nécessaires pour évaluer l'efficacité et la sécurité de ce traitement et pour définir la dose appropriée. Pour ces raisons, la SAM n'est pas utilisée en traitement de routine chez les patients à l'heure actuelle (Bell et al., 2016; B. C. Chen et al., 2014; Dolcetta et al., 2013; Harris, 2018; Lauber et al., 2017; Madeo et al., 2019; Momosaki et al., 2019).

Une seconde approche pour le traitement des troubles compulsifs d'automutilation par morsure et des dystonies, consiste à injecter dans les biceps et les masséters (muscles de la mastication) de la toxine botulique. Des premiers essais au début des années 2000 ont montré

une diminution des automutilations par morsures chez deux patients MLN, un enfant et un adulte (Dabrowski et al., 2005; Gutierrez et al., 2008). Plus récemment, un essai chez un patient a montré que l'injection de la toxine dans les muscles masticateurs avait permis de réduire l'automutilation par morsure et d'améliorer les troubles de la parole et de la mastication chez ce patient (Gilbert et al., 2021). Dans une autre étude conduite chez six patients, les tests ont montré une amélioration complète ou partielle des comportements agressifs compulsifs de morsures (Garcia-Romero et al., 2022).

Enfin pour des cas plus sévères, la stimulation cérébrale profonde c'est avérée être efficace pour diminuer les dystonies, l'agressivité et les automutilations par morsure (Abel et al., 2014; Harris, 2018; Madeo et al., 2019). Une étude (Visser et al., 2021) chez 14 patients a permis de relever une variabilité et des effets indésirables chez certains patients et de tempérer les conclusions positives d'études plus anciennes sur cette technique qui ne semble pas toujours être bien tolérée (Madeo et al., 2019; Sutcliffe et al., 2021).

De façon générale, une des difficultés pour attester de l'efficacité et de la sureté d'un traitement est le peu de données analysables. En effet, chaque étude concerne un ou quelques patients, traités par différents centres ce qui peut biaiser l'évaluation réelle de l'efficacité. L'efficacité de la thérapie et la tolérance des traitements médicamenteux des troubles neurocomportementaux ont été résumées et représentées, par Madeo et al., 2019 d'après le recueil de données de 101 patients (Figure 27).

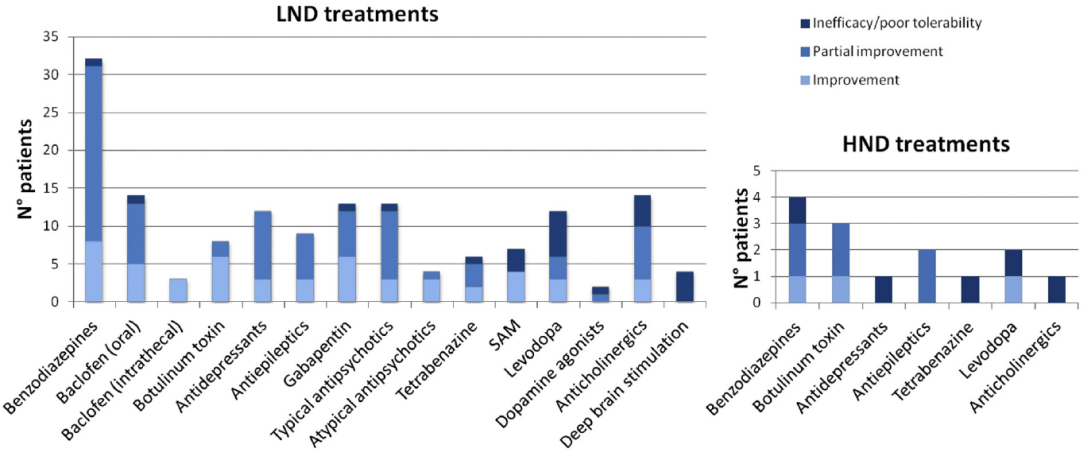


Figure 27 : Traitements administrés aux patients MLN et leur efficacité à corriger ou moduler les troubles comportementaux et neurologiques de la MLN.

Ces traitements ont été administrés à 101 patients avec déficit total en HPRT (MLN) et avec déficit partiel associé à des troubles neurologiques (HND) présentés dans l'article de Madeo et al., 2019. (Source : Madeo et al., 2019).

1.6. La maladie de Lesch-Nyhan : un trouble du métabolisme des purines

Présentation rapide du métabolisme des purines

Le métabolisme des purines peut être décomposé en deux voies principales permettant de maintenir le stock des purines et la synthèse des nucléotides. La première est la voie de synthèse *de novo* qui permet, à partir du Ribose-5-phosphate et du PRPP, de produire l'IMP, le GMP et l'adénosine monophosphate (AMP) qui seront ensuite convertis en guanosine triphosphate (GTP) ou adénosine triphosphate (ATP) (Figure 28) (Fu et al., 2014; Townsend et al., 2018). La deuxième voie de synthèse des purines est en fait une voie de recyclage, qui grâce à une enzyme en particulier va permettre de convertir la guanine et l'hypoxanthine en GMP et IMP respectivement. On estime que chez l'humain, 90% des purines libres sont recyclées (Stout & Caskey, 1985; Townsend et al., 2018). Lorsqu'il n'y pas de recyclage, pour les 10% restants, les purines sont dégradées via la voie de l'hypoxanthine en acide urique (Fumagalli et al., 2017) (Figure 28).

Conséquences du déficit en HGPRT sur le métabolisme des purines

Comme déjà expliqué précédemment, le déficit en enzyme HGPRT chez l'Homme a pour conséquence un déficit en recyclage des purines. Cela va alors entraîner une diminution de la voie de biosynthèse et de la production des nucléotides AMP, IMP et GMP associée à une production excessive du métabolite toxique de cette voie de synthèse : l'acide urique (Ceballos-Picot et al., 2015; Torres & Puig, 2007; Visser et al., 2000).

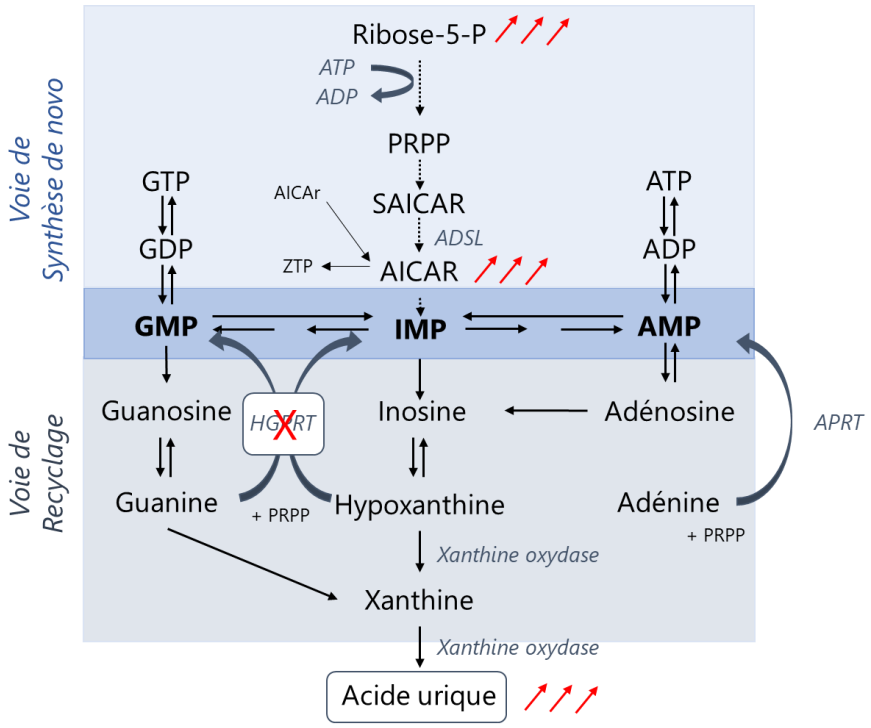


Figure 28 : Schéma représentant les conséquences du déficit en HGPRT sur le métabolisme des purines.

L'enzyme HGPRT est l'enzyme clé de cette voie de recyclage. Le déficit en HGPRT entraine une accumulation en acide urique, métabolite toxique de la synthèse des purines accompagnée d'une déplétion des produits de la voie de synthèse et une augmentation de la synthèse de novo. ADP : adénosine diphosphate. ADSL : adénylosuccinate lyase ; AICAR : 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide ; AMP : adénosine monophosphate. APRT : adénine phosphoribosyltransférase. ATP : adénosine triphosphate. GDP : guanosine diphosphate. GMP : guanosine monophosphate. GTP : guanosine triphosphate. HGPRT : hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase. IMP : inosine monophosphate. PRPP : phosphoribosylpyrophosphate. Ribose-5-P : ribose-5-phosphate. SAICAR : succinylaminoimidazole-carboxamide riboside ; ZTP : AICAR triphosphate. (Sources : Adapté de Ceballos-Picot et al., 2015; Torres & Puig, 2007).

On retrouve alors une augmentation de certains métabolites de la voie de synthèse *de novo* comme le 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide (AICAR, également retrouvé sous le nom de ZMP) dans les érythrocytes de patient (Ceballos-Picot et al., 2015; Sidi & Mitchell, 1985) ainsi qu'en ZTP (forme triphosphate de AICAR). L'accumulation en Z-nucléotides (AICAR et ZTP) a également été retrouvée dans des fibroblastes de patients (López et al., 2020). L'accumulation de ces intermédiaires s'accompagne d'une déplétion en ATP dans

les deux types cellulaires. Une des hypothèses émises pour expliquer la pathologie a d'ailleurs été que la déplétion en ATP impacterait le taux de nucléotides à adénine et de l'adénosine (Visser et al., 2000). De plus, il a été observé une diminution du transport de l'adénosine dans des lymphocytes du sang périphérique de patients MLN par rapport au contrôle (Torres et al., 2004) ainsi que des perturbations de l'expression de certains récepteurs à l'adénosine. Il a été observé que l'excès d'hypoxanthine dans des neurones différenciés à partir de la lignée NT2/D1 entraînait une augmentation de l'expression du récepteur à l'adénosine A2A (Torres & Puig, 2015). A l'inverse, des analyses PCR de l'expression de A2A de cerveau de souris modèles de la pathologie ont décrit une diminution de son expression (Bertelli et al., 2006). Cette diminution de l'expression du Rc A2A est retrouvée dans des lymphocytes de sang périphérique de patients MLN (García et al., 2012).

Les analyses métaboliques conduites dans des progéniteurs de neurones DA induits à partir de CSP présentées dans Bell et al. 2021 suggèrent également une augmentation de AICAR et ses dérivés, de Ribose-5-P, de PRPP accompagnés d'une diminution en nucléotides AMP, IMP et GMP et d'une déplétion en ATP. De plus l'accumulation d'AICAR entraine une diminution de l'activité de l'enzyme adénylosuccinate lyase (ADSL), dont le déficit est associé à un trouble rare entraînant un retard psychomoteur, des crises d'épilepsies, des troubles du spectre autistique ou encore une atrophie cérébrale (Dewulf et al., 2022; Fumagalli et al., 2017; H. A. Jinnah et al., 2013).

2. Les nDA dans la maladie de Lesch-Nyhan

L'ensemble des symptômes moteurs de la maladie de Lesch-Nyhan, les dystonies et les manifestations pyramidales, extrapyramidales et cognitives de la pathologie suggèrent une implication importante des ganglions de la base dans la pathologie (H. A. Jinnah et al., 2006; Visser et al., 2000). Cependant, plusieurs éléments tirés d'études réalisées sur des cerveaux post-mortem ou d'imagerie chez des patients MLN vont dans le sens d'un dysfonctionnement de l'ensemble des nDA, et pas seulement de ceux de la substance noire innervant les ganglions de la base, dans la maladie.

2.1. Analyses biochimiques

Les différences de sévérité dans les troubles neurologiques associés aux variants MLN suggèrent un lien entre les mutations de HPRT1 et le développement neurologique. Des analyses des fluides, tels que le plasma et le liquide cérébrospinal ont d'abord montré une altération des neurotransmetteurs chez les patients Lesch-Nyhan. Les patients Lesch-Nyhan présenteraient d'après ces premières études une diminution de l'activité plasmatique d'une enzyme responsable de la métabolisation de la DA en norépinéphrine : la dopamine-β-Hydroxylase (Lake & Ziegler, 1977). Des analyses du liquide spinal ont montré une diminution de deux produits du catabolisme de la DA dans les premières années de vie, l'acide homovanillique (HVA) et l'acide 5-hydroxyindolacétique (Silverstein et al., 1985). Ces études ont mis en évidence une altération du métabolisme dopaminergique chez les patients atteint de la MLN. Des altérations ont également été observées lors de mesures histochimiques réalisées à partir de tissus cérébraux issus d'autopsies de patients atteints de la MLN. Dans une première étude, il a été observé une réduction de la DA et de son métabolite l'HVA dans plusieurs structures cérébrales (noyau caudé, putamen, Gpe et noyau accumbens) allant de 10% à 30% dans les tissus de patients (Lloyd et al., 1981) (Tableau 3). Ensuite, dans une seconde étude, il a été observé une altération de l'expression des Rc D1 et D2 au niveau du noyau caudé et du putamen (Saito et al., 1999). Dans d'autres études histopathologiques sur des tissus cérébraux d'autopsie de cinq patients MLN les auteurs ont pu observer une diminution de la mélanisation des neurones au niveau de la SNpc ainsi qu'une diminution de l'immunoréactivité de la TH par rapport aux tissus contrôles (Göttle et al., 2014). Dans des modèles de la pathologie, des souris *HPRT-*, des niveaux réduits de la DA ont été observés dans le cerveau de façon générale, mais en particulier au niveau noyau caudé et putamen (Dunnett et al., 1989; H. Jinnah et al., 1994; Meek et al., 2016). Toutes ces données mises ensembles confirment qu'il existe un lien entre l'HGPRT et le métabolisme dopaminergique.

Table 3. Indexes of Dopamine-Neuron Function in Brain Regions from Controls and Patients with the Lesch–Nyhan Syndrome.*

Substance	Group	Caudate Nucleus	Putamen	External Pallidum	Nucleus Accumbens	Substantia Nigra
Dopamine (μg/g tissue) †	Control	4.61±0.25	5.01±0.50	0.79±0.14	2.88±0.15	0.92±0.21
	No.	7	7	6	6	4
	Lesch–Nyhan	1.53±0.50 ‡	0.53±0.16 ‡	0.14±0.05 ‡	0.53±0.31 ‡	0.65±0.10
	No.	3	3	3	3	3
Homovanillic acid (μg/g tissue) §	Control	5.63±0.55	9.87±1.48	5.72±1.11	6.18±1.04	6.79
	No.	5	7	6	6	1
	Lesch–Nyhan	1.75±0.29 ‡	1.76±0.50 ‡	2.48±0.21 ‡	2.56±0.28 ‡	2.37±0.36
	No.	3	3	3	3	3
Dihydroxyphenylacetic acid (μg/g tissue) ¶	Control	0.40±0.06	1.04±0.30	—	—	—
	No.	3	3			
	Lesch–Nyhan	0.72±0.21	0.32±0.14	—	—	—
	No.	3	3			
Dopa decarboxylase (nmol CO_2/ mg protein/2 hr)	Control	—	5.32±1.49	—	—	—
	No.		5			
	Lesch–Nyhan	—	0.57±0.16 ‡	—	—	—
	No.		3			
Tyrosine hydroxylase (nmol CO_2/ 100 mg protein/hr)	Control	6.84±1.48	8.09±1.41	—	—	19.43±1.07
	No.	4	6			4
	Lesch–Nyhan	1.96±0.35 ‡	1.55±0.44 ‡	—	—	5.90 (5.86; 5.94) ‖
	No.	3	3			2

*Data are expressed as the mean ±S.E.M. †To convert to micromoles per kilogram of body weight, multiply by 6.54. ‡P<0.01 vs. controls.
§To convert to micromoles per kilogram, multiply by 5.49. ¶To convert to micromoles per kilogram, multiply by 5.95. ‖Individual values are given instead of S.E.M.

Tableau 3 : Mesure de la fonctionnalité des nDA dans différentes structures cérébrales de patients LND et de contrôles.

Dans ces travaux il a été observé une réduction de la DA et de son métabolite l'HVA dans plusieurs structures cérébrales (noyau caudé, putamen, Gpe et noyau accumbens) allant de 10% à 30% dans les tissus de patients (Source : Lloyd et al., 1981).

2.2. Imagerie cérébrale

Plusieurs études de neuroimagerie mettent en évidence des altérations au niveau de la transmission dopaminergique. C'est le cas de deux études, celle de Wong et al., 1996 et Ernst et al., 1996. Dans la première, les patients MLN présentent une diminution de la liaison du radioligand WIN-35-428, ligand des transporteurs de la DA suggérant un déficit en terminaisons présynaptiques dopaminergiques (Wong et al., 1996) (Figure 29).

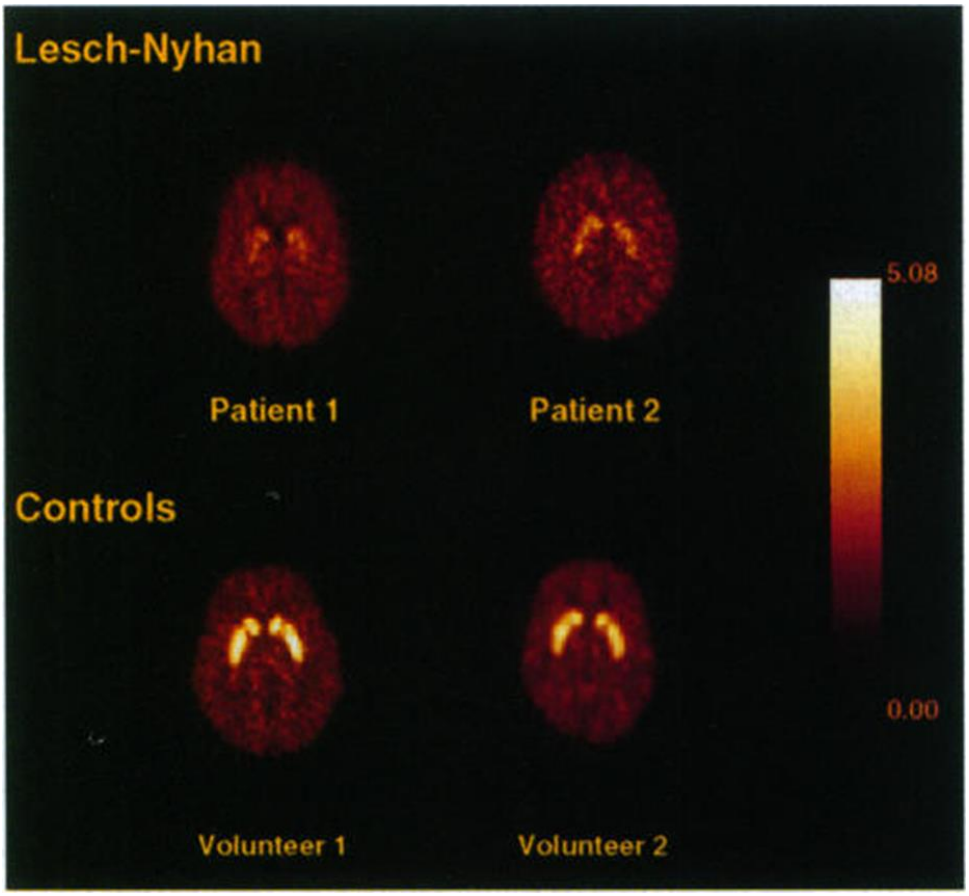


Figure 29 : PET-scan de deux patients MLN et de deux individus contrôles du même âge.

Exemple de PET-scan chez deux patients MLN et deux individus sains du même âge que les patients. On observe une réduction la détection du radio-ligand WIN-35-428, ligand des transporteurs de la DA au niveau du putamen et du noyau caudé chez les patients MLN par rapport aux individus sains. (Source : Wong et al., 1996).

L'imagerie a montré également une diminution de l'activité enzymatique et du stockage de la dopamine dans les régions présynaptiques des ganglions de la base et d'autres zones. Cette diminution semble donc concerner tous les neurones DA et pas seulement ceux des ganglions de la base (Ernst et al., 1996) (Figure 30).

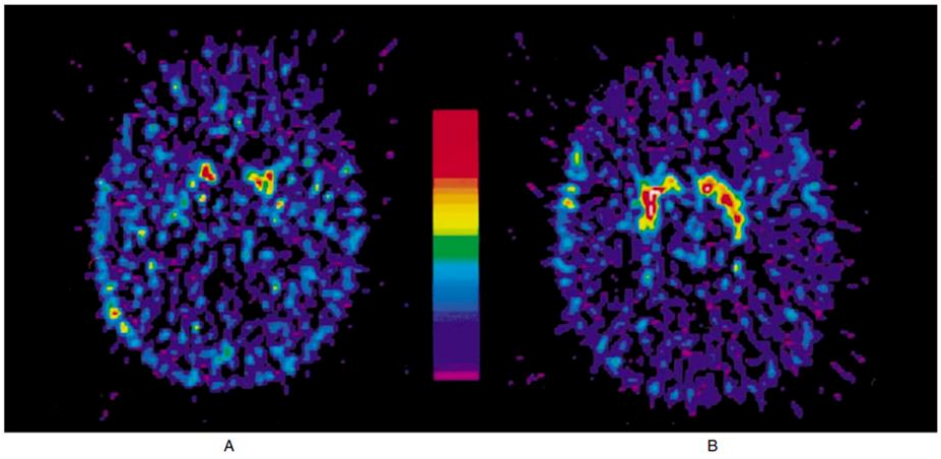


Figure 30 : PET-scan d'un patient MLN et d'un individu contrôle du même âge.

Exemple de PET-scan des ganglions de la base réalisé chez deux individus du même âge. Il représente la mesure de la Fluorodopa F 18 après métabolisation d'un traceur analogue de la DA par la dopa décarboxylase. On peut observer une diminution de la Fluorodopa F18 chez le patient MLN (A) par rapport au volontaire sain (B), suggérant une diminution de l'activité enzymatique. (Source : Ernst et al., 1996).

Une autre étude, cette fois-ci en IRM, chez sept patients MLN et sept individus contrôles a montré que chez cinq patients sur sept il y avait une diminution du volume des neurones des ganglions de la base de 34% au niveau du noyau caudé et de 12% au niveau du putamen (Harris et al., 1998).

2.3. Hypothèses sur les causes de la pathologie

Hypothèse du stress oxydant et des métabolites toxiques

Plusieurs mécanismes possibles ont été proposés en plus des déficiences en nucléotides pour expliquer la pathogenèse relative au déficit en HGPRT. En plus des déficiences en AMP, ATP ou en adénosine déjà évoquées, l'accumulation de métabolites toxiques, le stress oxydant ou encore le déficit en nucléotides à guanine ont été proposés. Ces hypothèses mécanistiques sont détaillées dans la revue de (Visser et al., 2000). Parmi celles-ci, l'hypothèse du stress oxydant propose comme mécanisme que les dommages cellulaires et les dysfonctions neuronales soient causés par la libération d'espèces radicales comme le peroxyde d'hydrogène

ou d'anions superoxydes issus du catabolisme de l'hypoxanthine et de la DA. Cependant des preuves expérimentales de ces mécanismes restent encore manquantes. Un autre de ces mécanismes est l'accumulation de métabolites potentiellement toxiques (López, 2008) issus de la voie *de novo* de synthèse des purines : les Z-nucléotides (ZTP, ZMP ou AICAR) Leur accumulation a été retrouvée dans des érythrocytes, les fibroblastes et le liquide céphalo-rachidien de patients Lesch-Nyhan (Ceballos-Picot et al., 2015; López et al., 2020; Sidi & Mitchell, 1985). L'accumulation anormale d'AICAR entraînerait un effet cytotoxique dans une pathologie génétique rare neurodéveloppementale, l'AICA-ribosidurie (Marie et al., 2004; Ramond et al., 2020). La toxicité de ces molécules pourrait être liée au fait que les ZMP, en fonctionnant comme des analogues de l'AMP, agiraient sur la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK), enzyme clé dans l'homéostasie, la croissance cellulaire et la prolifération au niveau du SNC et dont la dérégulation pourrait être impliquée dans des maladies neurodégénératives comme la maladie Parkinson (Hang et al., 2019; Marinangeli et al., 2016). L'HGPRT pourrait également être impliquée de façon indirecte avec la synthèse de la DA via le GTP. En effet, le métabolisme des purines permet de fournir du GTP qui est essentiel à la synthèse de la BH_4. Pour rappel, la BH_4 est le cofacteur de la TH pour la conversion de la tyrosine en L-DOPA, une déplétion en GMP et GTP entraînerait donc une diminution de ce cofacteur et impacterait la production de DA. Le déficit en BH4 a été observé chez des souris déficientes en HGPRT (Hyland et al., 2004).

Implication des voie adénosinergiques et sérotoninergiques

En plus de l'implication des neurones DA dans la physiopathologie de la maladie des études ont également soulevé l'hypothèse d'une implication d'autres neurotransmetteurs tels que l'adénosine et la sérotonine, notamment dans les troubles compulsifs d'automutilation par morsure pour cette dernière. Trois neurotransmetteurs et leurs récepteurs semblent donc être dérégulés dans la MLN : la dopamine, la sérotonine et l'adénosine (García et al., 2012; Saito & Takashima, 2000). Contrairement à la DA, c'est une augmentation de l'activité sérotoninergique qui semble être observée (Saito & Takashima, 2000). Ces déséquilibres des systèmes adénosinergiques, dopaminergiques et sérotoninergiques ont été retrouvés chez des souris KO Hprt- utilisées comme modèle de la MLN (Bertelli et al., 2006, 2009; Dunnett et al., 1989; H. Jinnah et al., 1994; Tschirner et al., 2016). De plus, le dosage protéique dans des érythrocytes de patients a montré une augmentation du taux du Rc D_5, une expression aberrante du Rc A2A

et une diminution du taux du Rc à la sérotonine 5-HTR1A (García et al., 2012).

Bien que l'ensemble de ces éléments mettent en évidence un lien entre les troubles du métabolisme purinergique et le phénotype dopaminergique de la pathologie, l'origine du dysfonctionnement des nDA dans la maladie de Lesch-Nyhan reste encore à déterminer. Toutefois, la perte de l'enzyme HGPRT semble être liée à une certaine vulnérabilité sélective de la population dopaminergique qui émerge au cours de la neurogenèse.

2.4. Les modèles d'étude de la maladie de Lesch-Nyhan

Les premiers modèles d'études et de diagnostic de la maladie de Lesch-Nyhan ont été les cellules primaires directement prélevées chez les patients ou des tissus cérébraux *post-mortem* issus d'autopsies (Lloyd et al., 1981; Rassin et al., 1982; Saito et al., 1999). Parmi les cellules primaires utilisées entre autre pour la mesure de l'activité de l'HGPRT on retrouve notamment des cellules présentes dans le sang comme les érythrocytes (Ceballos-Picot et al., 2015; Lowy & Williams, 1977; Sidi & Mitchell, 1985) et les lymphocytes (García et al., 2009, 2012), mais également des fibroblastes (Fu et al., 2015). Ces modèles cellulaires ont surtout permis d'étudier les aspects métaboliques consécutifs à la mutation du gène *HPRT1* dans des cellules non neuronales et ne permettent pas d'en étudier les conséquences neurologiques ou les troubles cognitifs retrouvés chez les patients. La maladie de Lesch-Nyhan étant une maladie rare et face à la difficulté d'accéder à des tissus ou cellules cérébrales, d'autres modèles, animaux et *in vitro*, ont été développés afin d'explorer ces aspects de la pathologie (Bell et al., 2016).

Les modèles animaux

- Les modèles phénotypiques et pharmacologiques

Plusieurs modèles dits phénotypiques ont été utilisés, pour étudier un aspect comportemental de la maladie : l'automutilation compulsive par morsure. Le premier est le rat néonatal 6-OHDA. Les rats, modèles rongeurs privilégiés pour l'étude des pathologies neuronales et la modélisation des pathologies neuronales humaines, ont été traités à la 6-

hydroxydopamine (6-OHDA) pendant la période néonatale. La 6-OHDA provoque la destruction spécifique des neurones dopaminergiques entrainant ainsi la déplétion des stocks de DA. Lorsque ces rats sont traités à l'âge adulte avec le précurseur de la dopamine L-DOPA cela entraîne l'apparition de comportement d'automutilation par morsure accompagnée d'une augmentation de l'agressivité (Bell et al., 2016; Breese et al., 1984, 2005). Un second modèle a également été créé avec ce principe. L'administration d'agoniste de la DA chez des singes présentant une dénervation de la voie dopaminergique nigrostriatale provoquée par des lésions tegmentales ventro-médianes unilatérales du tronc cérébral, a conduit à l'apparition de comportement d'automutilation par morsure compulsive chez ces animaux (Goldstein et al., 1986). Un modèle de morsure compulsive a également été exploré chez des rats traités, qui après des traitements chroniques à la caféine (antagoniste des Rc à l'adénosine) et à la pemoline (psychostimulant bloquant la recapture des monoamines), ont développés ces troubles (Bell et al., 2016; D. P. Devine, 2019).

De façon générale on retrouve chez ces modèles des comportements compulsifs et une hypersensibilité à la DA. Toutefois, ils ne présentent pas la mutation gène *HPRT1* et les conséquences de la perte de l'enzyme à l'origine de la pathologie. Ils ne permettent donc pas d'en étudier ou de modéliser les mécanismes métaboliques.

- Les modèles génétiques KO HGPRT

Afin de modéliser la déficience du gène *HPRT,* des modèles génétiques ont été développés. Les premiers modèles de cette mutation sont les souris rendues déficientes pour le gène *HPRT* via l'injection de cellules embryonnaires murines HPRT-, soit provenant de la sélection de variants spontanés (Hooper et al., 1987) soit par l'insertion d'un vecteur rétroviral entraînant la perte de l'HGPRT (Kuehn et al., 1987), dans des blastocystes de souris générant ainsi des embryons murins chimériques préimplantatoires à partir de ces cellules. Chez ces souris HGPRT-, l'absence d'activité enzymatique dans des homogénats de tissus cérébraux a bien été confirmée. Bien qu'entraînant une altération de la voie du recyclage des purines comme chez l'Homme, les auteurs ont pu constater que les souris conservaient un contenu en purines normal au niveau cérébral. Ils ont pu mettre en évidence l'existence d'un système de compensation, une accélération de la voie de synthèse de novo des purines permettant de conserver ce taux de purines malgré l'absence de la voie de recyclage (H. A. Jinnah et al., 1993).

Les souris HGPRT- ne présentent ni les troubles liés à une SAU ni les troubles comportementaux associées à la maladie. Premièrement, elle possèdent l'uricase, une enzyme qui permet de dégrader l'acide urique qui résulte du métabolisme des purines en allantoïne (H. A. Jinnah et al., 1993). Deuxièmement, afin de provoquer des stéréotypies et des comportements d'automutilation par morsure, il est nécessaire de les traiter avec des amphétamines (H. A. Jinnah et al., 1991). Cela indique tout de même une sensibilité aux catécholamines. Le second mécanisme de compensation proposé, a été que la perte de l'enzyme HGPRT serait compensée via le recyclage par l'enzyme APRT. En administrant un inhibiteur de cette enzyme, il a été possible d'observer les comportements compulsifs d'automutilation chez les souris (Wu & Melton, 1993). Un autre modèle de souris déficient en HGPRT et en APRT a alors été généré, toutefois bien que n'ayant plus aucune des deux voies de recyclage, les souris HGPRT-/APRT- n'ont pas présenté le phénotype recherché (Engle et al., 1996).

Le rat étant un modèle animal privilégié pour étudier les pathologies et la physiologie du cerveau, plus récemment un modèle de rat déficient pour l'HGPRT a été développé par Meek et al., 2016 en utilisant la méthode des cellules souches embryonnaires KO pour l'enzyme HGPRT. Leur modèle présente les mêmes altérations du recyclage des purines et du métabolisme des nucléotides retrouvées chez les patients MLN mais conserve un comportement normal (Meek et al., 2016). Un modèle chimère souris-rat KO pour l'HGPRT a également été développé en injectant des cellules souches embryonnaires de rats KO HGPRT dans des blastocystes de souris (Isotani et al., 2016). Ces modèles présentent bien l'absence d'activité enzymatique mais ne semblent pas non plus développer de phénotype comportemental (Isotani et al., 2016). Dans les deux exemples (Isotani et al., 2016; Meek et al., 2016), les clones de cellules souches embryonnaires de rat KO pour l'HGPRT ont été sélectionnés grâce à la 6-thioguanine (6-TG). La 6-TG est un analogue de la guanine qui est converti par l'HGPRT en un métabolite toxique pour les cellules. Elle permet de sélectionner les clones chez les lesquels l'enzyme est absente.

Dans l'ensemble aucun modèle animal ne permet de représenter la complexité des symptômes de la MLN. Aucun modèle de permet de combiner manifestations cliniques et fond génétique de la pathologie.

Les modèles cellulaires in vitro

Plusieurs lignées cellulaires ont été utilisées pour créer des modèles déficients en HGPRT. Ces lignées cellulaires sont d'origine tumorales, issues en majorité de neuroblastomes. Parmi ces lignées, on retrouve la lignée SH-SY5Y dérivée de cellules de neuroblastome humain (Guibinga et al., 2010, 2013; Kang et al., 2011), la lignée SK-N-BE(2) M17 issue de neuroblastome humain dopaminergique (Shirley et al., 2007) ou la lignée MD9D dérivée de cellules de neuroblastome murin (Ceballos-Picot et al., 2009; Guibinga et al., 2013; Lewers et al., 2008). Il y a également d'autre cellules d'origine neurale comme la lignée B103 4C provenant de cellules de névrome de rat (Zoref-Shani et al., 1993). Enfin, d'autres types de lignées cellulaires ont été modifiées pour étudier la déficience en HGPRT, la lignée NTERA-2 clone D1 (NT2/D1) issue d'un carcinome embryonnaire humain (Torres & Puig, 2015), ou encore les lignées PC12 (Bitler & Howard, 1986; Yeh et al., 1998) et PC6-3 (Dammer et al., 2015) issues de phéochromocytomes (tumeurs des cellules chromaffines de la médullo-surrénale) capables de produire de la DA.

La nature de ces lignées cellulaires fait que leur utilisation en tant que modèle de la MLN présente des limites. Premièrement, les cellules ne possèdent pas naturellement la perte de l'enzyme HGPRT et ne permettent d'étudier que des altérations secondaires à la mutation chez des cellules déjà différenciées. Elles ne permettent pas de modéliser les conséquences neurodéveloppementale de la déficience enzymatique. Deuxièmement, toutes ces lignées ne sont pas des cellules dopaminergiques, une population de neurones particulièrement impliquée dans la MLN, et quand elles sont capables de synthétiser de la DA elles n'appartiennent pas au lignage neural (sauf pour la lignée SK-N-BE(2) M17).

Toutefois, ces modèles ont été utilisés pour tenter d'établir le lien entre HGPRT et déficit en DA dans la MLN.

2.5. Relation entre l'HGPRT et les facteurs déterminant l'identité dopaminergique du MV au cours du développement

Des études plus récentes dans des modèles cellulaires ont démontré l'évidence d'une origine neurodéveloppementale de la maladie. Ces différentes études ont montré une relation fonctionnelle entre la déficience en HGPRT causée par la mutation de *HPRT1* et une altération

des facteurs de transcription essentiels pour la spécification et le maintien des neurones DA du MV (Ceballos-Picot et al., 2009; Guibinga et al., 2012; Kang et al., 2011; Torres & Puig, 2015). Il y aurait donc un lien entre le gène codant pour l'enzyme HGPRT et les mécanismes de développement précoce responsables de l'établissement des neurones DA du MV au cours du développement. Une de ces études a montré qu'il y aurait une augmentation des mRNA pour En-1 et En-2 chez différents modèles cellulaires déficients pour l'HGPRT (établis à partir de lignées de neuroblastomes murins et de neuroblastomes humains, comparés également à des fibroblastes de patients MLN). Cette augmentation des mRNA est accompagnée d'une augmentation des protéines Engrailed (Ceballos-Picot et al., 2009). Ils observent an revanche une diminution des neurites dans ces modèles. Dans une autre étude, les auteurs ont montré en étudiant le transcriptome et l'expression des gènes dans des fibroblastes de patients MLN et des cellules d'une lignée de neuroblastome humain (cellules SH-SY5Y) rendues déficientes en HGPRT, une dérégulation des voies de signalisation essentielles à la neurogénèse et la neurodégénérescence (Kang et al., 2011). En effet, la voie de signalisation canonique Wnt/β-caténine, qui est capitale pour les neurones DA du MV, est dérégulée (la β-caténine est séquestrée au niveau cytosolique) entraînant ainsi une régulation négative des deux facteurs de transcription En-1 et Lmx1a dans les cellules avant et après différenciation. Ils constatent également une dérégulation de la voie de signalisation de la presenilin-1, impliquée dans la maladie d'Alzheimer. Toujours en comparant des cellules SH-SY5Y et des fibroblastes humains tous déficients pour l'HGPRT, une troisième étude a montré que dans les cellules de neuroblastomes la surexpression d'un microARN entraînerait la diminution de l'expression endogène des gènes En-1/2, Lmx1a et Brn2 (Guibinga et al., 2012). Ils observent aussi une diminution de l'expression d'autres gènes d'intérêt dans la spécification dopaminergique tels que Nurr1, Pitx3 et Wnt1. Ils n'ont pas observé cette surexpression de microARN dans les fibroblastes en revanche. Enfin, en exposant des neurones dopaminergiques et leur progéniteurs différenciés à partir de cellules de carcinome embryonnaire humain à l'acide rétinoïque et à un excès d'hypoxanthine, les gènes WTN4 et EN se retrouvent dérégulés (Torres & Puig, 2015). Cette dérégulation est accompagnée d'une augmentation de l'expression de la TH, d'un récepteur à la DA (D_1) et d'un récepteur à la sérotonine (HTR7).

La diminution de la β-caténine phosphorylée indiquant une dérégulation de la voie WNT a également été retrouvée dans des cellules hiPSC KO pour l'HGPRT par rapport au contrôle

hiPSC (Mastrangelo et al., 2012).

Plus récemment, deux publications de Bell et al., 2021 et de Witteveen et al., 2022 ont montré une diminution de l'intensité de différents marqueurs essentiels dans le développement. Ils ont observé une diminution des marqueurs Nurr1, FoxA2 et Otx2 dans les lignées KO établies à partir de cellules d'un individu contrôle reprogrammées en cellules souches puis dérivées en progéniteurs du mésencéphale (Bell et al., 2021). Ils ont également constaté une diminution de la TH dans les cellules déficientes en HGPRT différenciées en neurones, ainsi qu'une diminution de la concentration en DA, DOPAC et HVA. Dans leur travaux, Cristini et al., 2010 ont pu observer l'effet du déficit en HGPRT dans des NSC humaines isolées de cerveaux fœtaux MLN et constater une expression aberrante de plusieurs facteurs et marqueurs dopaminergiques (Cristini et al., 2010).

Enfin, une étude chez un modèle embryonnaire de souris HGprt- a révélé une désorganisation au niveau développemental affectant le réseau TH projetant sur le cortex (Witteveen et al., 2022). Cette désorganisation est accompagnée d'une augmentation de la prolifération des cellules au stade progéniteurs au niveau du domaine dopaminergique du mésencéphale ainsi que d'une migration prématurée de ces progéniteurs. Cette migration précoce aurait comme conséquence une augmentation de la taille des aires contenant des cellules positives pour la TH sans en augmenter le nombre (Witteveen et al., 2022) ainsi que des différences de répartition le long de l'axe rostro-caudal entre les contrôles et les HGprt-. Les sous-types cellulaires semblent également être impactés par la mutation, ils observent une diminution au niveau caudal du marqueur Otx2 (neurones de la VTA) et une augmentation du marqueur Sox6 en ventral (neurones de la SNpc) chez les neurones matures. Enfin, ils observent également une diminution du marqueur Nkx6.1, un marqueur des neurones non DA du mésencéphale : les neurones OC et du NR. Les résultats peuvent sembler contradictoires en fonction de l'origine des cellules utilisées comme modèles pathologiques.

Toutes ces études suggèrent qu'il existe un lien établi entre *HPRT1* et les facteurs de transcription essentiels pour l'établissement, la localisation et l'identité des neurones DA du mésencéphale ventral au cours du développement.

Afin de pouvoir explorer les mécanismes à l'origine des altérations des nDA dans la maladie de Lesch-Nyhan au cours du développement, les cellules souches pluripotentes

semblent être le modèle le plus adapté étant donné l'origine développementale de la pathologie.

PRESENTATION ET RATIONNEL DU PROJET

Environnement scientifique

Depuis 2005, l'institut des cellules souches pour le traitement et l'étude des maladies monogéniques (I-Stem) se consacre à la recherche sur les maladies génétiques et la mise au point de traitements. Cet institut de recherche appliquée se compose de deux entités, l'UMR 861 (associé à l'Inserm et à Université d'Evry) et le Centre d'Etude des Cellules Souches (CECS, associé à l'AFM-Téléthon).

Les actions du laboratoire ont été développées suivant trois grands axes. Le premier, la modélisation physiopathologique, afin de développer des modèles permettant d'explorer et de comprendre le développement et les mécanismes moléculaires conduisant aux maladies d'intérêt. Le second axe, le criblage à haut débit, permet de rechercher et d'isoler de façon automatisée des molécules à potentiel thérapeutique grâce à des banques de molécules chimiques et de médicaments repositionnables appelées chimiothèques en les testant sur les modèles développés. Le troisième axe concerne les thérapies innovantes : le développement de thérapie cellulaire de substitution (https://www.istem.eu/). Pour cela, I-Stem dispose de plateformes technologiques dédiées au développement : de biologie cellulaire, de bioproduction, de criblage à haut débit (HTS), d'imagerie à haut contenu (HCS) ou encore de séquençage (NGS) (https://www.istem.eu/).

L'équipe Neuroplasticité et thérapeutiques, au sein de laquelle ont été effectués mes travaux de thèse, développe et adapte des protocoles de différenciation afin de modéliser et d'étudier *in vitro* le développement du cerveau à partir de CSPh en 2D ou en 3D (Figure 31). Ces protocoles permettent d'obtenir différents types de cellules nécessaires à l'études des pathologies neurodéveloppementales intéressant l'équipe. Parmi ces cellules, on retrouve des cellules souches neurales (NSC), des progéniteurs neuroépithéliaux, des astrocytes ou encore des neurones (corticaux, dopaminergiques, sérotoninergiques, OC, etc.). Les pathologies principalement étudiées sont des troubles neurodéveloppementaux tels que le syndrome de Lesch-Nyhan, des troubles sévères du spectre autistique d'origine génétique associés à des mutations du gène SHANK3 (SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3) et également des atteintes neurologiques de myopathies comme celles associées à la mutation du gène DMD

dans la myopathie de Duchenne. En plus de ses projets principaux, l'équipe travaille également en collaboration avec des industries pharmaceutiques sur des projets concernant des maladies rares et étend ses axes de recherche à d'autres pathologies neuropsychiatriques comme l'épilepsie ou les troubles bipolaires.

Afin de réaliser ces travaux, l'équipe Neuroplasticité et thérapeutiques travaille en collaboration avec les plateformes de HTS, NGS, HCS du laboratoire. Le travail de développement pour la miniaturisation au format automatisé et standardisé des protocoles et les criblages eux-mêmes ont déjà permis à l'équipe d'améliorer la différenciation de neurones corticaux (Boissart et al., 2013) ou encore l'amplification de NSC humaines (Georges et al., 2015). Enfin, le criblage à haut débit a également permis à l'équipe d'identifier des molécules à potentiel thérapeutique permettant de corriger les phénotypes neuronaux associés à l'haploinsuffisance du gène SHANK3 ou syndrome de Phelan-McDermid (Darville et al., 2016) et pour ceux associés à la maladie de Lesch-Nyhan (Ruillier et al., 2020). À la suite des travaux de Darville *et al*., 2016 un essai clinique est d'ailleurs en phase d'inclusion (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04623398) avec une des molécules, le lithium carbonate.

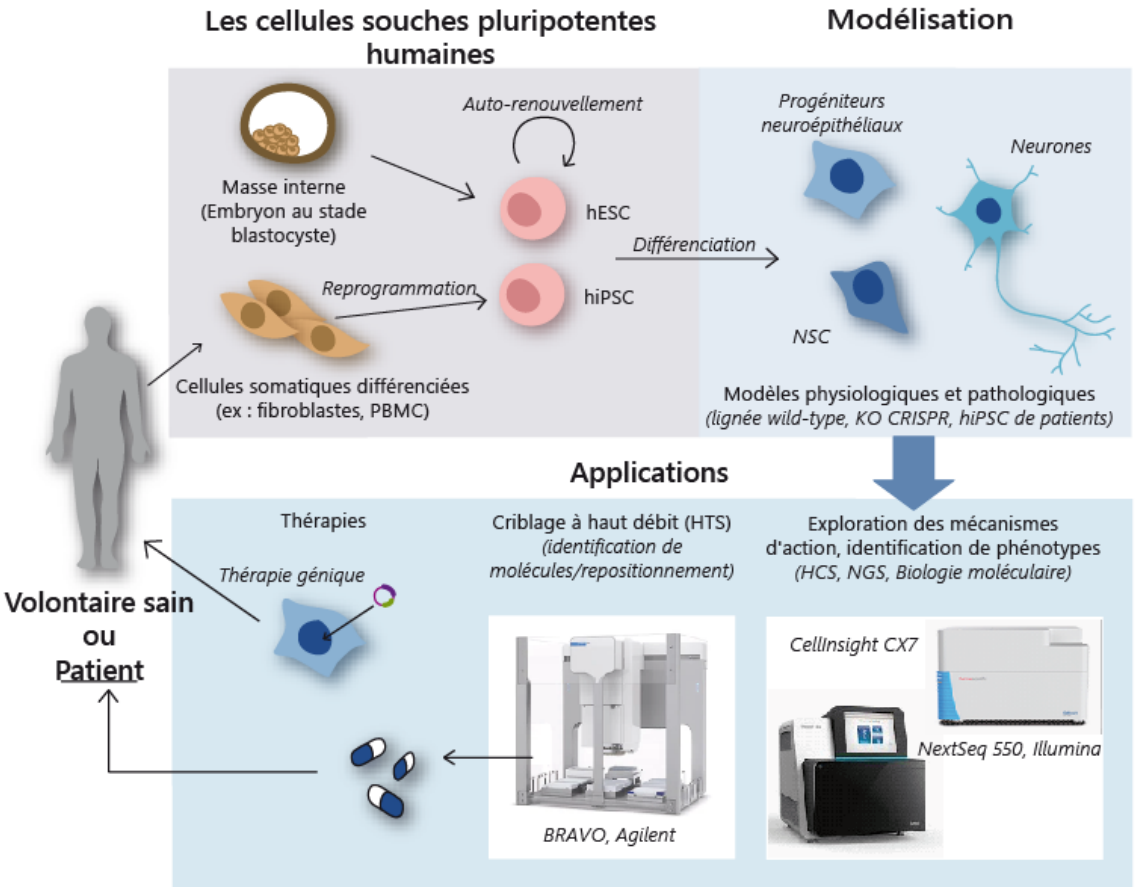


Figure 31 : Stratégies de recherche appliquées et/ou envisagées de l'équipe Neuroplasticité et thérapeutiques.

L'équipe modélise des pathologies génétiques rares neurodéveloppementales afin d'en étudier les mécanismes physiopathologiques. Elle travaille avec les différentes plateformes de criblage, d'imagerie et de NGS afin d'explorer les voies de signalisation impliquées dans ces pathologies et également pour identifier des molécules à visée thérapeutique.

Objectif du projet de thèse

L'objectif du projet est de développer un test de criblage à haut débit pour identifier des molécules pouvant augmenter la spécification des progéniteurs des neurones DA à partir d'une population de progéniteurs du MV et d'identifier des voies de signalisation jouant un rôle central dans ce processus. Pour cela, la première étape du projet a consisté à miniaturiser un protocole optimisé en amont dans l'équipe à partir des informations décrites dans la littérature (Chambers et al., 2009; Kirkeby et al., 2012; Kriks et al., 2011; Nolbrant et al., 2017). La deuxième étape a été de cribler une banque de composés (Figure 32). Pour faire la preuve de concept de la pertinence de ce test nous nous sommes basés sur la maladie de Lesch-Nyhan et avons donc choisi de cribler une banque de composés purinergiques et adénosinergiques, des voies impliquées dans cette pathologie. Pour sélectionner les composés le critère choisi a été la colocalisation des marqueurs des progéniteurs dopaminergiques EN-1 et de celui du plancher ventral, FOXA2, exprimés par les progéniteurs matures des nDA du MV et facteurs de transcription importants dans la spécification ventrale et l'identité dopaminergique de ces progéniteurs au cours du développement.

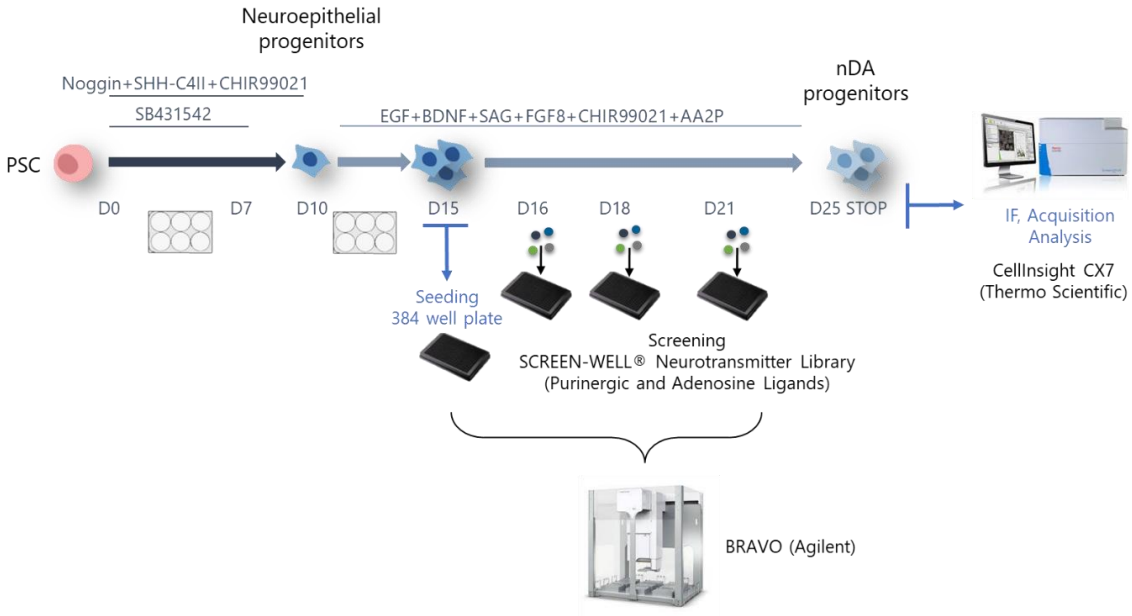


Figure 32 : Protocole du criblage primaire.

Schéma du protocole suivi pour le criblage primaire et les « retests » en doses-réponses. Les progéniteurs neuroépithéliaux ont été ensemencés en microplaque à J15 puis les traitements ont été effectués au robot à J16, J18 et J21. Les cellules ont été fixées à J25 pour quantifier les progéniteurs des nDA.

MATERIELS ET METHODES

Les matériels et méthodes présentés dans la partie suivante sont ceux utilisés pour les travaux de thèse et ceux décrits dans la suite des résultats. Certaines parties sont reprises plus en détail dans l'article. (Cf. partie Résultats, Article incluant les travaux de recherche). Cette partie contient également des informations non décrites dans l'article.

1. Culture cellulaire

Toutes les cellules en cultures ont été mises dans des incubateurs dans un environnement propice à leur croissance (37°C et 5% de CO_2) à l'abri de la lumière.

1.1. Matériel biologique

La lignée « wild type » hiPSC de référence qui a été utilisée pour le criblage primaire est la lignée PDF01 (clone 6). Pour la reproductibilité et l'affinage du choix de la dose, les composés retenus lors du criblage primaire ont été testés en doses-réponses (DR) sur trois autres lignées « wild-type » : la 4603 clone 45, la PC056 clone 2 et la SA001. L'ensemble des caractéristiques concernant les CSPh ont été reprises dans le tableau suivant (Tableau 4).

Nom de la lignée	Code pour les figures	Type cellulaire	Cellules d'origine	Fournisseur	Caryotype	Description clinique
PDF01 (Clone 6)	PDF01	hiPSC	Fibroblastes	ATCC, Etats-Unis	46, XX	Wild type (Non mutée)
GM4603 (Clone 45)	4603	hiPSC	Fibroblastes	Coriell, Etats-Unis	46, XY	Wild type (Non mutée)
PC056 (Clone 2)	PC056	hiPSC	Fibroblastes	Phenocell, France	46, XX	Wild type (Non mutée)
SA001	SA001	hESC	Blastocystes	Cellartis, Suède	46, XY	Wild type (Non mutée)

Tableau 4 : Nom et caractéristiques des différentes lignées de CSPh utilisées pour les travaux de recherche.

1.2. Culture des CSPh :

Les CSPh ont été décongelées et ensemencées dans des boîtes de Petri Easy Grip 353001 (35x10mm) de chez Falcon®. Les boîtes de Petri ont au préalable subi un traitement à la VTN recombinante humaine de chez Invitrogen™ (5 ng/mL dans du Phosphate buffered saline ou PBS de chez Sigma-Aldrich®). Le « coating » a été déposé au minimum une heure à température ambiante avant ensemencement. Les cellules ont été cultivées dans le milieu spécifique de chez Miltenyi Biotec : le milieu basal StemMACS™ Ips-Brew XF (500 mL) supplémenté avec l'Ips-Brew XF Supplement (10 mL). A ce milieu ont été ajoutés des antibiotiques : pénicilline et streptomycine de chez Gibco™ Thermo Fisher Scientifc (10,000 U/mL, 1 : 100). Lors de la décongélation afin de prévenir la mort par apoptose des cellules, du ROCK Inhibitor (ou Y-27632), un inhibiteur sélectif de la Rho-associated protein kinase de chez Tocris Bioscience™ (10 µM) a été ajouté au milieu pendant 48 heures. Le milieu a été renouvelé tous les deux jours avec un « nettoyage » des plages de cellules entrées en différenciation. Les cellules sont passées manuellement à l'aiguille une fois par semaine dans une nouvelle boîte de Petri pour amplification.

1.3. Dérivation des progéniteurs DA du mésencéphale ventral à partir de CSPh

Comme développé précédemment dans la présentation du projet, le protocole d'induction des progéniteurs dopaminergiques du mésencéphale ventral a été adapté aux besoins de l'équipe Neuroplasticité et thérapeutiques à partir de ceux développés dans la littérature, en particulier Kirkeby et al., 2012; Nolbrant et al., 2017.

Induction neurale à partir de CSPh

Une fois à confluence et au plus bas passage possible, les CSPh ont été décollées avec de la Trypsine-EDTA 0.05% de chez Gibco™ pendant cinq minutes à l'incubateur. Pour arrêter l'effet de la Trypsine, du sérum de veau fœtal (SVF) pur de chez Eurobio Scientific (10% du volume de la Trypsine) a ensuite été rajouté. Pour l'induction, les CSPh décollées ont été comptées au Scepter™ 3.0 Handheld Automated Cell Counter de chez Millipore® afin de prélever les 600 000 cellules nécessaires. Les cellules ont été ensuite centrifugées pendant cinq minutes à 1 200 rpm puis les culots cellulaires ont été repris dans le milieu d'induction (2 mL de volume de travail) pour être ensemencés dans des plaques Costar 6 puits « Low attachment

» de chez Corning. Les plaques « Low attachment » sans « coating » ont été utilisées pour la formation des corps embryoïdes (EB). Le milieu de culture d'induction est composé du milieu neural basal appelé N2B27 auquel ont été ajoutées différentes cytokines en fonction des étapes du protocole. La composition du N2B27 est la suivante : 50% de Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F-12 + Glutamax™ de chez Gibco™, 50% de Neurobasal™ Medium de chez Gibco™, 1% de Supplément N2 de chez Gibco™, 2% de Supplément B27 de chez Gibco™ et de 2-Mercaptoethanol de chez Life Technologies (50 µM). Pour les cultures, a été également ajouté 1 % de Pénicilline/Streptomycine de chez Life Technologies™. Pour l'induction le milieu neural basal a été supplémenté avec deux inhibiteurs de la voie des SMAD : la protéine NOGGIN de chez PeproTech® (100 ng/mL) et le SB431542 de chez PrepoTech® Bio-Gems (10 µM) ; ainsi qu'avec la protéine recombinante Sonic Hedgehog ou SHH-C24II de chez Miltenyi Biotec, (500 ng/mL), l'inhibiteur de GSK-3β : CHIR99021 de chez PeproTech® Bio-Gems (0,8 µM). Du ROCK inhibitor a été ajouté 48 heures à la même concentration que pour la décongélation des CSPh. Celui-ci a été retiré lors d'un changement du milieu au bout de 48 heures. Après quatre jours de formation, les EB ont été ensemencés dans les plaques 6 puits 3506 de chez Corning ayant au préalable subi un « coating » de Poly-L-Ornithine ou PO de chez Sigma-Aldrich® (1 : 6 pendant 5 heures minimum), de Laminine ou Lam de chez Gibco™ Thermo Fisher Scientific (2,34 ng/mL) pendant 4 heures minimum après deux lavages de la PO au PBS, combinée à de la fibronectine de chez Sigma-Aldrich® (5 µg/mL) ; le tout dans du PBS 1X. Entre le quatrième et le septième jour d'induction les « rosettes neurales » sont apparues dans les plages de cellules formées par les EB étalés. A partir du septième jour d'induction, le SB431542 a été retiré du milieu d'induction jusqu'au dixième jour de l'induction neurale.

Spécification du domaine des progéniteurs neuronaux du MV

Au J10 de l'induction neurale, les « rosettes neurales » se sont formées et contiennent les progéniteurs neuroépithéliaux. Ils ont été sélectionnés manuellement par aspiration à la pipette pour être ensemencés dans une nouvelle plaque 6 puits, toujours préparée au préalable avec le mélange de PO-Lam et fibronectine. Pour la spécification des progéniteurs dopaminergiques précoces et leur prolifération à partir des rosettes neurales, un nouveau mix de cytokines a été nécessaire. Ont été ajoutés dans le N2B27 : le facteur de croissance épidermique ou EGF de chez PeproTech® (10 ng/mL), le facteur neurotrophique issu du cerveau ou BDNF de chez PeproTech® (20 ng/mL), le facteur de croissance recombinant

humain des fibroblastes ou FGF-8b de chez PeproTech® (100 ng/mL) et l'agoniste du récepteur Smoothened (Smo) aux morphogènes Hedgehog (Hh) ou SAG de chez Sigma-Aldrich® (500 nM). Du CHIR99021 (0,8 µM) ainsi que l'acide ascorbique 2-phosphate ou AA2P de chez Sigma-Aldrich® (200 nM) ont également été ajoutés. Ce milieu a été utilisé du J10 au J25 de la différenciation des progéniteurs pour permettre leur amplification et maturation. La culture des progéniteurs issus des rosettes a été effectuée de J15 à J25 en microplaque 384 puits de chez Corning® (modèle 3764), en flasque de culture Nunc™ EasYFlask™ 25cm² Nunclon™ DeltaSurface (appelée T25 par la suite) de chez ThermoScientific ou en plaque Costar®6 puits (référence 3506) en fonction de l'expérience qui a été réalisée. Pour changer de format de culture les cellules ont été décollées et comptées selon le même protocole que pour lancer l'induction. Les progéniteurs J15 ont été ensemencés à hauteur de 25 000 cellules/cm² pour le criblage et 20 000 cellules/cm² pour les autres travaux. Un « coating » PO-Lam (sans fibronectine) a été réalisé sur les plaques et flasques de culture pour ensemencer les progéniteurs. Le ROCK inhibitor (10 µM) a également été ajouté pendant les 24 heures suivant le changement de format.

Une étape de congélation des cellules a été réalisée à J15 de l'induction des cellules (avant traitement) afin d'optimiser le temps de lancement des tests suivants. La congélation d'une banque de progéniteurs à J15 a permis de relancer les traitements et différenciation plus rapidement en limitant également les biais provoqués par différentes inductions et d'avoir une population de départ plus homogène.

1.4. Différenciation terminale des progéniteurs en neurones DA

Pour la différenciation des progéniteurs en neurones il a fallu décoller les progéniteurs à J25 des flasques de culture toujours à l'aide de la Trypsine-EDTA. Les progéniteurs ont alors été ensemencés dans des microplaques de culture 384 puits de chez Corning® (modèle 3764) à une densité de 35 000 cellules par cm². Pour les neurones dopaminergiques il a fallu cette fois-ci rajouter la fibronectine à la laminine pour le « coating » (PO-Lam-fibronectine). Le jour d'ensemencement des progéniteurs à J25 avec le milieu de différenciation terminal équivaut au J0 des neurones (pour la partie Résultats du manuscrit). Le milieu de culture nécessaire à la différenciation en neurones dopaminergiques a été le suivant : dans le N2B27 ont été ajoutés du BDNF de chez PeproTech® (20 ng/mL), du GDNF de chez PeproTech® (10 ng/mL) et du

ROCK inhibitor (10 µM, pour les premières 24 heures). Après le premier jour de différenciation (neurones J1) le ROCK inhibitor a été retiré lors du changement de milieu et remplacé dans le mix par du DAPT de chez Tocris Bioscience™ (1 µM) pour le reste de la différenciation.

1.5. Contrôles qualités (CQ) des CSPh et des progéniteurs dérivés

Afin de contrôler la qualité des lignées cellulaires (CSPh et progéniteurs dopaminergiques) des contrôles de conformité génotypique des SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) de l'échantillon ont été réalisés (Figure 33). Les échantillons sont comparés soit aux cellules de la banque à plus bas passage avant amplification pour les CSPh, soit par rapport aux CSPh de départ pour les progéniteurs induits à partir de ces cellules, soit par rapport aux cellules à partir desquelles la reprogrammation a été réalisée (exemple : les fibroblastes de départ). Ces CQ ont été réalisés par la Plateforme de Biologie cellulaire dédiée au sein du laboratoire.

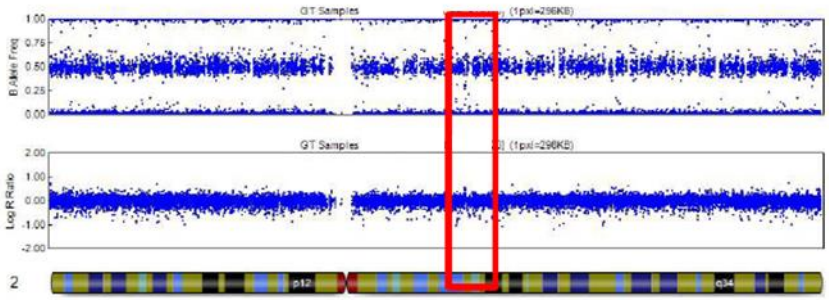


Figure 33 : Exemple d'un contrôle de conformité génotypique des SNP sur le chromosome 2 d'un échantillon de progéniteurs neuroépithéliaux à J15.

Les progéniteurs à J15 induits avec le protocole de différenciation des CSPh en progéniteurs dopaminergiques du MV présentent une duplication en 2q21.1. Cette duplication est similaire à celle détectée chez les fibroblastes ayant servis à la reprogrammation en CSPh. Le contrôle de conformité génotypique des SNP a été réalisée par la plateforme de Biologie cellulaire du laboratoire. (Source : Données personnelles).

Le CQ des cultures, inductions, amplifications ou différenciations passe également par un contrôle visuel des cellules au microscope ou encore à l'aide de Incucyte® S3 Live-Cell Analysis Instrument de chez Sartorius qui permet un suivi en direct ou en continu des

microplaques de cellules (Figure 34).

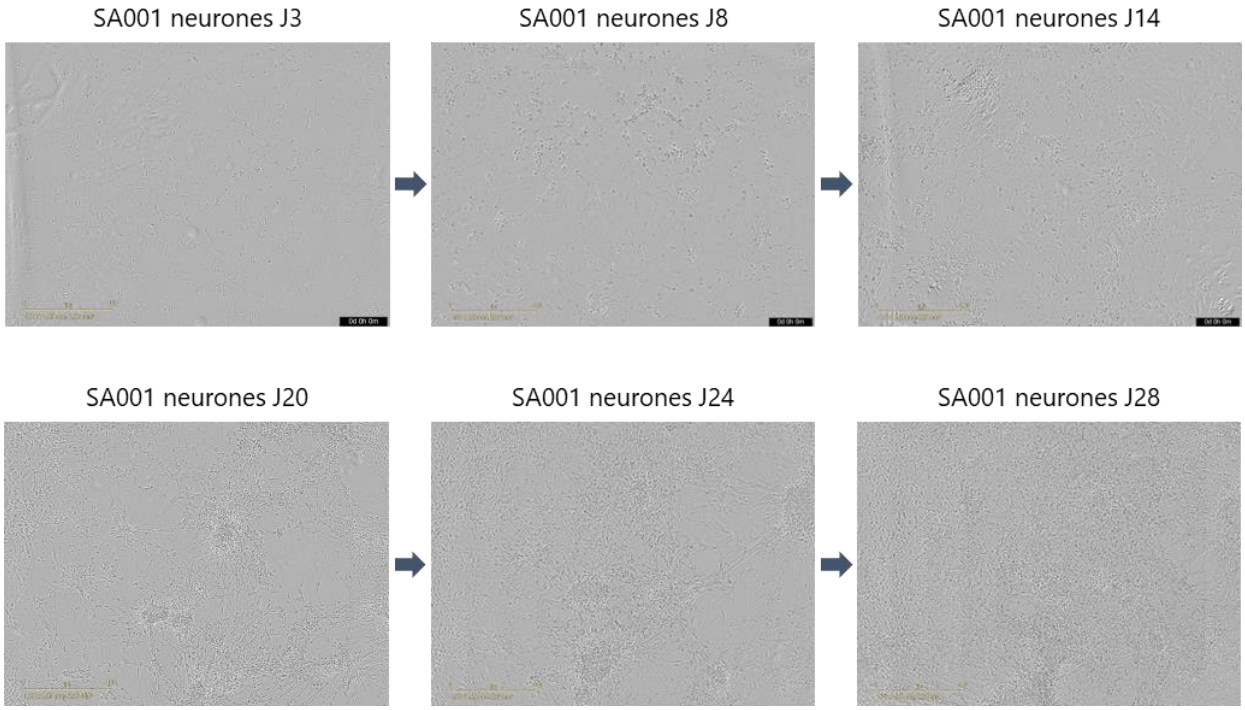


Figure 34 : Exemple du suivi à l'aide de l'Incucyte® S3 Live-Cell Analysis Instrument de chez Sartorius d'un puits de plaque 384.

Les photos prises grâce à l'Incucyte montrent le suivi de différenciation terminale de la lignée SA001 pendant 28 jours. Les images représentent le même puits de microplaque 384 puits à différents temps de différenciation : J3, J8, J14, J20, J24 et J28 (dernier jour de différenciation). (Source : Données personnelles).

2. Caractérisation des progéniteurs et des neurones matures

2.1. Immunofluorescence (IF)

Préparation des cellules

Les progéniteurs neuronaux ensemencés à J15 en microplaque 384 puits ont été fixés à J25, soit après 10 jours d'amplification et/ou de traitement. La fixation a été réalisée à l'aide du robot EL406 de chez BioTek® qui combine à la fois un laveur de plaques et un distributeur de

réactifs permettant l'optimisation de la distribution des liquides dans les microplaques et l'amélioration de la stérilité. Ce robot est couplé au stockeur de microplaques BioStack™4 permettant de fixer et de laver plusieurs microplaques successivement de façon automatisée. Après aspiration des milieux, les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde ou PFA 16% (Electron Microscopy Sciences) dilué à 4% dans du PBS 1X à raison de 40 µL par puits. Le temps de fixation a été de 10-15 minutes à température ambiante. Une fois que le temps de fixation a été écoulé, trois lavages au PBS 1X (200 µL par puits) ont été réalisés, toujours au laveur de plaque, afin de retirer le PFA restant. Les cellules fixées ont été conservées dans du PBS 1X à 4°C et à l'abri de la lumière en attendant les marquages cellulaires. Les anticorps et les références utilisés pour les marquages sont résumés dans le Tableau 5.

Pour les neurones matures, la fixation a été réalisée si possible à J28 de différenciation terminale pour obtenir des cellules suffisamment matures, en cas de décollement du tapis cellulaire une fixation à partir de J21 est normalement suffisante. Les neurones ont été fixés selon le même protocole de fixation utilisé pour les progéniteurs à J25.

Marquages primaires

Pour effectuer les marquages, les anticorps ont été ajoutés à un mélange de PBS 1X, d'un détergeant le Triton™X-100 de chez Sigma-Aldrich® (0,3%) et d'albumine de sérum bovin ou BSA Sigma-Aldrich® (1%) pour permettre respectivement la perméabilisation et la saturation des anticorps en excès. Pour le marquage primaire, 35 µL de ce mélange ont été distribués dans chaque puits et les microplaques 384 puits ont été placées à 4°C et à l'abri de la lumière sur la nuit le temps du marquage.

Marquages secondaires

Après la pose du marquage primaire sur la nuit, les anticorps primaires ont été aspirés et les microplaques ont été lavées trois fois successivement au PBS 1X à l'aide du même robot laveur EL406 de chez BioTek® qui avait servi pour la fixation. Un second mix de marquage a été préparé toujours dans une solution de PBS 1X/Triton™X-100 0,3%/BSA 0,1%. Les anticorps secondaires ont été choisis en fonction de l'espèce hôte de l'anticorps primaire (Rabbit, Mouse ou Goat) et de la longueur d'onde (488, 594 ou 647). Du Hoechst (Invitrogen™, Thermo Scientific) dilué au 1 : 1 500 pour le marquage des noyaux a également été ajouté. Le volume

de marquage a à nouveau été de 35µL après aspiration du PBS 1X. Après un temps de pose de deux heures à température ambiante et à l'abri de la lumière, les microplaques ont été à nouveau lavées trois fois au PBS 1X puis conservées à 4°C et à l'abri de la lumière en attendant l'acquisition des marquages.

3. Expression du récepteur à l'adénosine ADORA3 chez les progéniteurs avant traitement

Culture des progéniteurs

Afin de valider les anticorps et la présence des récepteurs ADORA3 (A3) mais aussi des trois autres Rc à l'adénosine A1, A2A et ADORA2B (A2B) dans nos progéniteurs à J16 (jour du premier traitement lors des criblages), des progéniteurs congelés à J15 ont été décongelés dans des boîtes de culture spécifiques. Les cellules ont été fixées à la PFA 4% le lendemain à J16. Les progéniteurs ont été comptés au Scepter™ 3.0 Handheld Automated Cell Counter de chez Millipore® afin d'être ensemencés à 50 000 cellules/cm^2 soit 500 0000 cellules par µ-Dish. Ces boîtes sont des µ-Dish 35 mm high ibiTreat de chez ibidi® (référence 81156). Le fond spécial de ces boîtes a permis la culture des cellules pour de l'imagerie à haute résolution (compatible avec des microscopes optiques ou confocaux à balayage laser).

Immunofluorescence

Pour les marquages des Rc ADORA le protocole de marquage primaire et secondaire a été le même que pour les progéniteurs et les neurones. Le marquage primaire a été effectué sur la nuit à 4°C, puis le lendemain les anticorps ont été retirés avec trois lavages au PBS 1X et les anticorps secondaires ont été ensuite déposés et incubés à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les cellules ont été ensuite lavées à nouveau trois fois au PBS 1X. La seule différence est que pour marquer le cytoplasme des progéniteurs la phalloïdine-488 a été utilisée (déjà couplée à une sonde fluorescente à 488 nm : dans le vert) pour marquer les filaments d'actine F et observer la répartition des Rc dans la cellule. La liste des anticorps est reprise ainsi que leurs caractéristiques dans le Tableau 5.

Anticorps (cible)	Hôte	Référence	Fournisseur	Application (ou type de marquage)	Dilution
Anti-SOX2	Rabbit	AB5603	EMD Millipore Corp., Merck, Germany	IF (marquage primaire)	1 : 500
EN-1 ou 4G11 Engrail-1 Supernatant	Mouse	4G11	DSHB, USA	IF (marquage primaire)	1 : 100
Anti-FOXA2 ou anti-Hhnf-3β	Goat	AF2400	R&D Systems®, USA	IF (marquage primaire)	1 : 500
Anti-hOtx2	Goat	AF1979	R&D Systems®, USA	IF (marquage primaire)	1 : 500
Anti-Gbx2	Rabbit	21639-1-AP	Proteintech™, USA	IF (marquage primaire)	1 : 500
Anti-Tyrosine Hydroxylase	Rabbit	ab112	abcam, UK	IF (marquage primaire)	1 : 500
Anti-TPH2	Rabbit	ab11828	abcam, UK	IF (marquage primaire)	1 : 500
Human/Mouse/Rat Dopa Decarboxylase/DDC Antibody (Anti-AADC)	Goat	AF3564	R&D Systems®, USA	IF (marquage primaire)	1 : 100
Anti-HuC/HuD neuronal protein IgG2b, monoclonal 16A11	Mouse	A21271	Invitrogen™ Thermo Scientific, USA	IF (marquage primaire)	1 : 250
Anti-Girk2	Goat	ab65096	abcam, UK	IF (marquage primaire)	1 : 250
Anti-Calbindin	Rabbit	ab11426	abcam, UK	IF (marquage primaire)	1 : 500
ADORA1 Polyclonal Antibody (IgG)	Rabbit	PA1-041A	Invitrogen™ Thermo Scientific, USA	IF (marquage primaire)	1 : 500
ADORA2A Monoclonal Antibody (6A6G11)	Mouse	MA5-31611	Invitrogen™ Thermo Scientific, USA	IF (marquage primaire)	1 : 250
ADORA2B Polyclonal Antibody	Goat	PA5-18422	Invitrogen™ Thermo Scientific, USA	IF (marquage primaire)	1 : 100
ADORA3 Polyclonal Antibody *(Référence 1)*	Rabbit	PA5-102048	Invitrogen™ Thermo Scientific, USA	IF (marquage primaire)	1 : 250
ADORA3 Polyclonal	Rabbit	PA5-	Invitrogen™	IF (marquage	1 : 200

Antibody *(Référence 2)*		77279	Thermo Scientific, USA	primaire)	
Alexa Fluor™ 488 Phalloidin (actine F)	Peptide bicyclique issu du champignon *Amanita phalloïdine*	A12379	Invitrogen™ Thermo Scientific, USA	IF (marquage primaire car déjà couplé à une sonde fluorescente)	1 : 250
Anti-mouse (IgG H+L, Alexa Fluor™ 594)	Donkey	A21203	Invitrogen™ Thermo Scientific, USA	IF (marquage secondaire)	1 : 1 000
Anti-Goat (IgG H+L Alexa Fluor™ 647 conjugate)	Donkey	A21447	Invitrogen™ Thermo Scientific, USA	IF (marquage secondaire)	1 : 1 000
Anti-rabbit 488 (Alexa Fluor™)	Donkey	A21206	Invitrogen™ Thermo Scientific, USA	IF (marquage secondaire)	1 : 1 000
Anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ 647	Donkey	A31573	Invitrogen™ Thermo Scientific, USA	IF (marquage secondaire)	1 : 1 000

Tableau 5 : Récapitulatif des anticorps utilisés pour les marquages primaires et secondaires réalisés aux cours des travaux de thèse.

4. Acquisition et quantification des marqueurs

Marquages des microplaques

L'acquisition des marquages fluorescents a été réalisée grâce à la plateforme d'imagerie à haut contenu (HCS) composée du microscope automatisé CellInsight CX7 et du logiciel HCS Studio de chez Thermo Scientific. La première étape d'acquisition a été le réglage de l'autofocus sur le marquage au Hoechst (les noyaux des cellules). Puis, une fois le temps d'exposition calculé, les acquisitions des images et les réglages des autres marquages peuvent être réalisés. Les analyses des images ont été réalisées avec le logiciel HCS Studio en réglant les masques (Figure 35) adéquats au marquage que l'on veut analyser (corps cellulaire,

cytoplasme, enzymes etc.). L'acquisition et les analyses des progéniteurs à J25 ont été effectuées au grossissement 10X sur puits entier (9 champs). Celles des neurones à J28, au grossissement 20X sur puits entier (36 champs).

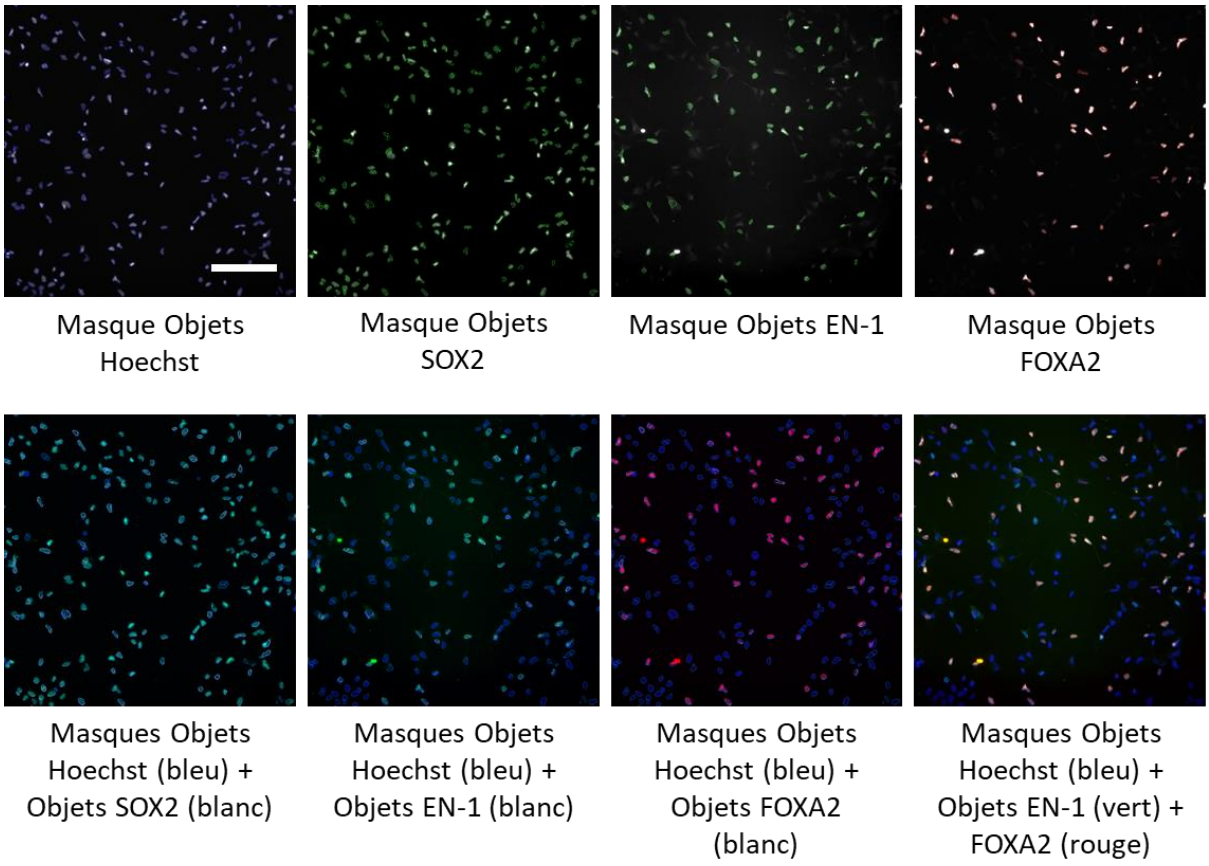


Figure 35 : Exemples de masques appliqués à des progéniteurs J25 pour une analyse des marquages des progéniteurs dopaminergiques.

Masques appliqués lors d'une analyse des progéniteurs dopaminergiques avec le logiciel HCS Studio de chez Thermo Scientific. L'analyse a été réalisée au 10X sur 9 champs. Les images ci-dessus représentent les masques seuls pour chaque marquage séparément (ligne du haut) et pour la colocalisation du marquage Hoechst avec un ou les marquages suivants : SOX2, EN-1 et FOXA2. Barre d'échelle : 100µm. (Source : Données personnelles).

Marquages des µ-Dish

Les images des IF des Rc ADORA ont été acquises grâce à la plateforme de microscopie, plus précisément le microscope optique inversé Axio Observer Z.1 de chez Zeiss au 40X à

immersion à l'huile avec le logiciel ZEN 2 de chez Zeiss.

5. Criblage dopaminergique

5.1. Miniaturisation du protocole

Pour réaliser le criblage primaire les cellules ont été ensemencées au format microplaque 384 puits à fond transparent de chez Corning® afin de permettre l'acquisition des marquages IF par l'imageur. Pour que les cellules adhèrent les plaques ont d'abord subi un « coating » de PO-Lam. Les progéniteurs dopaminergiques à J15 de l'induction ont été décollés à la Trypsine-EDTA 0.05% de chez Gibco™. Afin de stopper l'effet de la Trypsine, du sérum de veau fœtal pur (SVF) de chez Eurobio Scientific a été utilisé (1 : 3 du volume de Trypsine). Le nombre de progéniteurs nécessaires, soit 1 500 cellules par puits (25 000 cellules/cm^2) pour le criblage primaire, a été compté au Scepter™ 3.0 Cell Counter de chez Millipore®. L'ensemencement a été effectué de façon automatique à l'aide de l'automate BRAVO de chez Agilent, permettant la miniaturisation et manipulation des liquides de façon standardisée et reproductible. Grâce à ce robot, l'ensemencement a pu être réalisé de façon homogène assurant ainsi une répartition des cellules dans l'ensemble des puits (Figure 36). Durant les traitements de J15 à 25 le milieu et le mélange de cytokines reste le même, les antibiotiques ont en revanche été retirés pour éviter des interactions éventuelles avec les composés de la banque. Du ROCK inhibitor (1 : 1 000) a été ajouté pour le passage au format microplaque. Il a été retiré lors du premier changement de milieu et du criblage à J16. Le reste des progéniteurs a été congelé et conservé dans des cuves d'azote. Le mélange cryoprotecteur est composé de diméthylsulfoxyde (DMSO) de chez Sigma-Aldrich® (10%) et de SVF de chez Sigma-Aldrich® (90%). Les cellules ont été fixées à J25.

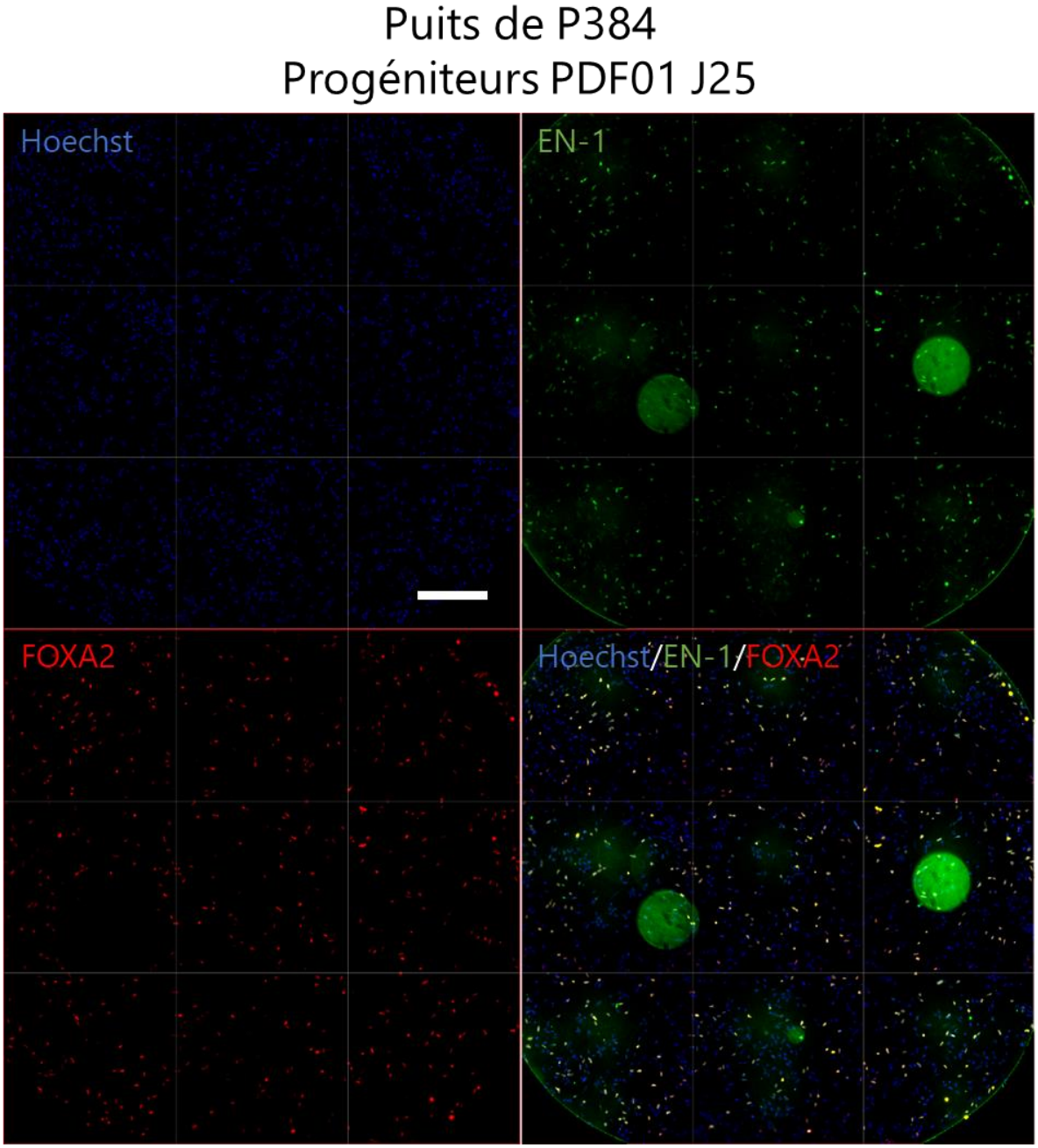


Figure 36 : Exemple d'un puits de plaque 384 puits ensemencé avec des progéniteurs PDF01 J25 au BRAVO pour un contrôle de l'induction.

La répartition des cellules est homogène grâce au robot permettant ainsi la bonne prolifération ou différenciation des cellules sans agrégats. Les progéniteurs dopaminergiques sont également répartis de façon homogène dans l'ensemble des puits. Barre d'échelle : 200µm. (Source : Données personnelles).

5.2. Criblage primaire

Pour le criblage primaire, la SCREEN-WELL® Neurotransmitter Library (Purinergic and Adenosine Ligands) ENZO Life Science a été choisie. Cette petite banque contient 73 composés ciblant le SNC et étant tous des ligands purinergiques ou adénosinergiques. Parmi ceux-ci, on retrouve des agonistes et des antagonistes des récepteurs purinergiques ou de l'adénosine, des neurotransmetteurs et également des molécules commercialisées en tant que médicaments. La liste des composés et leurs caractéristiques sont en Supplementary data du papier et en annexe du manuscrit (Tableaux S1 et S2).

La banque de molécules a été préparée au préalable par la plateforme HTS afin de pouvoir être adaptée pour la miniaturisation et pour les traitements au BRAVO. Les molécules ont d'abord été réparties dans une « plaque mère » de 96 puits de chez Costar®. Ils ont été repris soit dans du DMSO pur soit dans de l'eau en fonction de leur solubilité à 10mM. A partir de cette plaque, ils ont ensuite été répartis en deux « plaques filles » (1 et 2) de 96 puits V-Bottom à fond transparent de chez Greiner Bio-One. La répartition est telle que les puits sur les bords de la plaque sont vides pour éviter « l'effet bord ». Plusieurs « plaques filles » 1 et 2 ont été préparées et stockées à -80C pour permettre plusieurs traitements.

Le criblage s'est déroulé selon le schéma suivant : les cellules ont été traitées avec les molécules lors des changements de milieu à J16, J18 et J21 avec l'aide du BRAVO. Les volumes de reprise pour les traitements au BRAVO ont été calculés afin de traiter les progéniteurs à deux concentrations pour le criblage primaire : 5µM et 20µM (quatre plaques de traitement en tout à chaque traitement). Enfin, les composés ont été dispensés en quadruplicats dans les microplaques 384 puits à partir des plaques 96 puits (toujours avec l'aide du BRAVO) après chaque changement de milieu.

5.3. Retests en doses-réponses (DR)

Pour les « retests » en DR, les progéniteurs ont également été ensemencés à J15 dans des microplaques 384 puits à raison de 1 200 cellules par puits (20 000 cellule/cm^2) au BRAVO. Le même protocole et schéma de traitement (avec passage par une plaque 96 V-Bottom puits intermédiaire aux J16, J18 et J21) a été suivi, ce qui a permis le traitement des cellules en quadruplicats. Les plaques intermédiaires ont cette fois-ci été préparées manuellement. Les

composés sélectionnés lors du criblage primaire ont été recommandés pour avoir une quantité suffisante de composé les DR, leurs références sont détaillées dans la partie des résultats dédiée aux DR. Pour les « retests » les cellules ont été traitées avec les composés et les solvants à onze doses croissantes : 0,5µM, 1µM, 1,5µM, 2µM, 2,5µM, 5µM, 7,5µM, 10µM, 12µM, 15µM, 20µM.

6. Sélection des composés

Critères d'efficacité

Pour sélectionner les composés potentiels, les marqueurs suivants ont été choisis : SOX2, EN-1 et FOXA2. SOX2 afin de confirmer que les cellules présentes soient bien des progéniteurs neuraux et confirmer que l'induction dans le lignage neural se soit bien déroulée. Ensuite, pour sélectionner les composés lors du criblage primaire, le pourcentage de cellules marquées pour la colocalisation EN-1/FOXA2 par rapport aux cellules marquées Hoechst (le marquage Hoechst permet de quantifier le nombre de noyaux/objets par puits ; cf., Tableau 5) a été choisi comme « read-out ». Le nombre d'objets/cellules marquées Hoechst a également permis d'évaluer la toxicité des composés lors des « retests ». Les composés ont été sélectionnés avec comme critère d'efficacité leur capacité à augmenter le pourcentage de cellules co-marquées par rapport au puits contrôles, c'est-à-dire les cellules traitées avec les solvants des composés, le DMSO et l'eau. Il est important de vérifier que le solvant soit inerte, c'est-à-dire que l'effet du composé ne vienne pas de son action sur les cellules mais bien du composé lui-même. Le DMSO est un des solvants les plus utilisés en recherche notamment comme solvant de molécule pour les criblages ou comme agent pour la cryopréservation des cellules. Certains articles mettent en garde contre les effets potentiels du DMSO pour ces utilisations (Pal et al., 2012; Verheijen et al., 2019). En effet, ces études suggèrent que le DMSO aurait, en plus d'un effet sur le phénotype des cellules, un effet sur la structure de l'ADN et induirait des altérations de l'expression génique et épigénique (Pal et al., 2012; Tunçer et al., 2018; Verheijen et al., 2019). On retrouverait ces modifications dès de faibles concentrations de DMSO. Le DMSO est également connu pour agir sur la différenciation des CSPh et des EB (Chetty et al., 2013; Pal et al., 2012) en améliorant leur entrée en différenciation. Il est donc important de comparer l'effet de nos composés au CTL solvant afin de s'assurer de leur effet propre.

Concernant les différenciations terminales, le taux de neurones matures a été quantifié avec des marqueurs des neurones totaux : les protéines HuC et HuD (HuCD) (Akamatsu et al., 2005). Les neurones dopaminergiques ont été quantifiés grâce au co-marquage TH/AADC/HuCD, les neurones sérotoninergiques grâce au co-marquage TPH2/AADC/HuCD. TPH2, l'enzyme Tryptophane hydroxylase 2, exprimée dans les neurones sérotoninergiques, est l'enzyme limitante de la synthèse de la 5-HT. Les différentes populations de neurones dopaminergiques distinguées avec les anticorps primaires ciblant la Calbindine (Clb) pour la VTA et Girk2 pour la SNpc.

Enfin d'autres critères ont été observés. Pour regarder la maturité des nDA, l'aire des objets marqués pour HuCD et TH a été quantifiée.

Acquisition et analyses des données

Les marquages de progéniteurs et des neurones sont acquis avec l'imageur CellInsight CX7 et le logiciel HCS Studio (Thermo Scientific). Pour le criblage primaire les données ont été traitées par la plateforme HTS du laboratoire grâce aux « laboratoires » informatiques « Assay » et « Sample for assay » de chez Discngine (https://www.discngine.com/). Ils permettent de générer, gérer et analyser les différents résultats et échantillons présents dans la banque de molécules. La mise en page et la visualisation des données ont été réalisées avec l'aide du logiciel TIBCO Spotfire®. L'acquisition et les analyses des progéniteurs à J25 ont été effectuées au 10X sur puits entier (9 champs). Les hits du criblage primaire ont été sélectionnés en calculant le Z-score. Cette méthode permet de considérer chaque composé comme un contrôle et se calcule selon la formule suivante : $Z\text{-score} = (xn - \mu) / \sigma$ (Malo et al., 2006). Le Z-score correspond au nombre d'écart-types par rapport à la moyenne. Xn correspond à la valeur du « read-out » mesurée pour le composé n, μ est la moyenne et σ l'écart-type de l'ensemble des composés. Pour chaque composé, la variation de mesure a été mesurée par rapport aux autres de la microplaque, on parle alors de « Plate Z-score » (PZS). Elle est également mesurée par rapport à l'ensemble d'un run du criblage, c'est le « Run Z-score » (RZS). Afin d'observer si une tendance se dégage dans l'effet de nos molécules sur l'expression des marqueurs EN-1 et FOXA2 dans les progéniteurs et de sélectionner les hits primaires, un $Z\text{-score} > 1\sigma$ a été choisi. Les données des analyses des « retests » et des autres travaux ont été représentées sous forme de graphiques réalisés avec le logiciel d'analyses et de graphiques Prism de chez GraphPad.

RESULTATS

Les résultats dans la **Partie 1** se rapportent aux travaux de thèse présentés en partie dans un article soumis intégré en page 161. Une deuxième partie de résultats sur le développement autours du protocole est développée à la suite de l'article en **Partie 2**.

Ce qui suit est une introduction contenant des résultats antérieurs de l'équipe servant à apporter plus de détail sur le protocole utilisé et les lignées cellulaires éditées qui servent de modèle pour la maladie de Lesch-Nyhan.

Pour rappel, le protocole utilisé lors du criblage est décrit dans la figure 32 (Partie Présentation et rationnel du projet, chapitre Objectif du projet de thèse). Afin de quantifier la population d'intérêt, les progéniteurs des nDA du MV, le protocole s'arrête à J25 pour les progéniteurs à fixer et J24 pour les progéniteurs poussés ensuite en différenciation terminale en nDA. Pour le criblage, le protocole nécessite une étape de miniaturisation avec passage des progéniteurs à J15 en microplaque.

Le choix de stopper les progéniteurs à J25 (ou J24 pour la différenciation terminale) a été déterminé en amont dans l'équipe (article en préparation) et les résultats menant à ce choix sont présentés dans la figure suivante (Figure 37) Pour cela, l'expression des marqueurs SOX2, EN-1 et FOXA2 a été comparée aux temps J14, J18, J24 et J28 (Figure 37A). A chaque temps, les progéniteurs expriment tous le marqueur SOX2 spécifique des progéniteurs neuraux (Figure 37B) signe d'une induction neurale réussie. C'est chez les progéniteurs à J24 et J28 que l'on retrouve le pourcentage le plus élevé d'expression du marqueur du mésencéphale OTX2 (environ 40%) et surtout de sa colocalisation avec EN-1 qui marque le domaine dopaminergique (entre 30 et 40%), (Figure 37D, E). On retrouve également des progéniteurs du cerveau postérieur et du domaine sérotoninergique (respectivement GBX2 et sa colocalisation avec NKX2.2). Le protocole poussé jusqu'à J24 et J28 permet d'obtenir des progéniteurs dopaminergiques préférentiellement ainsi que des progéniteurs sérotoninergiques (Figure 37D, E). Afin de déterminer le temps optimal propice à la différenciation des neurones d'intérêt, les deux temps J24 et J28 ont été étudiés. Les IF des progéniteurs à J24 et à J28 pour ces marqueurs sont représentées dans la Figure 37G.

Les neurones résultants des différents types de progéniteurs ont ensuite été quantifiés. Pour les nDA, les enzymes TH et AADC ont été marquées. Pour les neurones 5-HT, c'est le marquage de TPH2 et AADC qui a été choisi. Enfin, pour les neurones oculomoteurs, qui émergent aussi du MV, Islet-1 a été quantifié (Figure 37F). C'est à partir des progéniteurs à J24 que l'on obtient le plus de nDA. A partir des progéniteurs à J28 ce sont les neurones oculomoteurs qui semblent être majoritaires. Ce qui semble logique avec la Figure 37C dans laquelle on observe que c'est à J24 qu'on obtient le plus de progéniteurs ventraux (FOXA2) par rapport aux domaines plus latéraux du mésencéphale (NKX6.1). Cet écart n'est plus visible à J28. Les IF des neurones DA (TH), sérotoninergiques (TPH2) et OC (Islet-1) différenciés pendant 28 jours à partir des progéniteurs à J24 et des progéniteurs à J28 sont représentées dans la Figure 37H. Les marqueurs sont colocalisés avec un marquage des protéines HuCD, protéines de liaison à l'ARN nécessaire à la maturation et à la différenciation neuronale chez les mammifères et utilisées ici comme marqueurs des neurones matures.

À la suite de ces résultats, le temps J24 a été choisi comme temps optimal pour la période d'amplification des progéniteurs avant différenciation, car c'est le temps auquel on obtient le plus de progéniteurs dopaminergiques du MV.

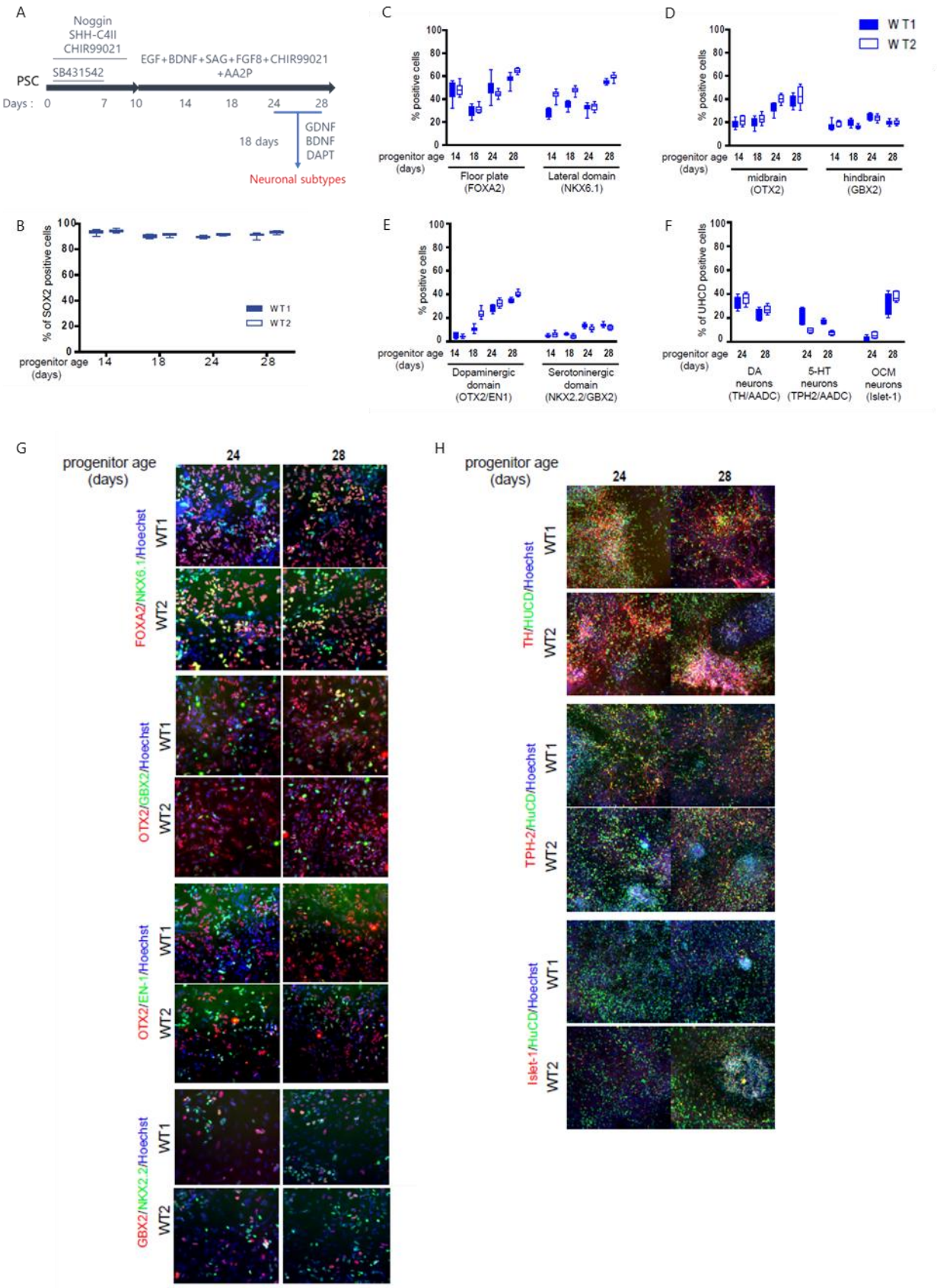


Figure 37 : Cinétique d'expression des marqueurs des domaines dopaminergique et sérotoninergique : détermination du temps de lancement optimal (J25) pour la différenciation

terminale en neurones d'intérêt.

Cinétique d'expression des marqueurs des progéniteurs dopaminergiques différenciés à partir de CSPh « wild-type ». (A) Rappel du protocole d'induction et de différenciation à différents temps : J14, J18, J24, J28. (B) Expression du marqueur SOX2 (%) chez les progéniteurs aux différents temps. (C) Pourcentage d'expression des marqueurs du plancher ventral (FOXA2) et des domaines latéraux (NKX6.1) aux différents temps. (D) Pourcentage d'expression des marqueurs du mésencéphale (OTX2) et du cerveau postérieur (GBX2) aux différents temps. (E) Pourcentage d'expression des marqueurs du domaine dopaminergique (colocalisation OTX2/EN-1) et du domaine sérotoninergique (colocalisation GBX2/NKX2.2) aux différents temps. (F) Pourcentage d'expression des marqueurs des neurones dopaminergiques (colocalisation TH/AADC), des neurones sérotoninergiques (colocalisation TPH2/AADC) et des neurones OC (Islet-1) aux différents temps. (G) Immunofluorescence des marqueurs des progéniteurs ventraux (FOXA2 en rouge) et latéraux (NKX6.1 en vert), des progéniteurs du mésencéphale (OTX2 en rouge) et du cerveau postérieur (GBX2 en vert), des progéniteurs du domaine dopaminergique (colocalisation de OTX2 en rouge et EN-1 en vert) et des progéniteurs du domaine sérotoninergique (colocalisation de GBX2 en rouge et NKX2.2 en vert) aux temps J24 et J28. (H) Immunofluorescence des populations des neurones DA (TH en rouge et HUCD en vert), 5-HT (TPH2 en rouge et HUCD en vert) et OC (Islet-1 en rouge et HUCD en vert) à J18 différenciés à partir des progéniteurs J24 ou J28. (Source : Adapté à partir d'un article en préparation).

Dans cette étude, nous avons utilisé des cellules saines dites « WT » et un modèle de lignée invalidée par CRISPR pour la HGPRT et considérée comme un modèle de la MLN. Cette lignée est appelée HGPRT-/Y. C'est une des deux lignées KO pour l'HGPRT (CRISPR-1 et CRISPR-2 sur la Figure 38) éditées à partir de la lignée hESC SA001 pour les travaux de Ruillier *et al*., 2020. Elles ont été éditées avec le système CRISPR-Cas9 puis sélectionnées par traitement à la 6-TG. Pour contrôler l'édition, l'expression de la protéine HGPRT a été analysée par Western blot dans des NSC dérivées des lignées CRISPR HGPRT et comparées à deux clones non édités (Figure 38A). La mesure de l'activité de l'enzyme a également été réalisée pour confirmer la déficience en HGPRT (Figure 38B). Enfin, les NSC ont été cultivées dans deux milieux contenant des inhibiteurs de la voie de synthèse *de novo* des purines, l'azasérine et l'aminoptérine (milieu HAT), pour révéler la perte de viabilité des cellules consécutive à l'absence de recyclage des purines (Figure 38C, D).

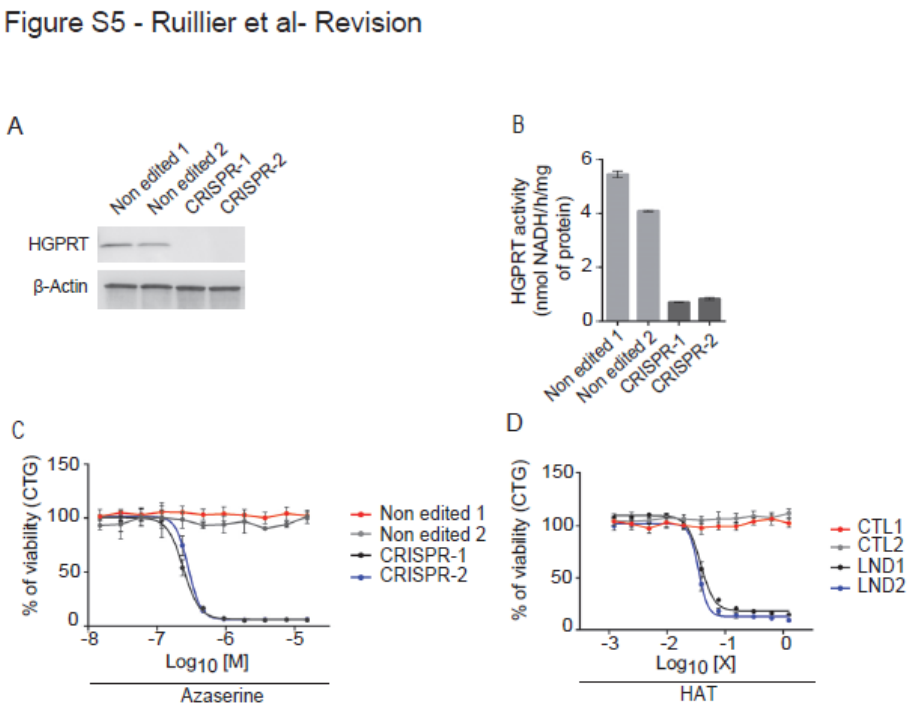


Figure 38 : Présentation des clones SA001 édités pour l'HGPRT (Ruillier et al., 2020).

(A) Analyse de l'expression de l'enzyme HGPRT dans les deux clones édités (CRISPR-1 et CRISPR-2) et les deux clones non édités par Western blot, la β-actine est utilisée comme protéine de ménage. (B) Mesure de l'activité enzymatique dans les clones édités (CRISPR-1 et CRISPR-2) et non édités. (C) Traitement des NSC par concentration croissante en azasérine et mesure de la toxicité sélective de la molécule sur les clones édités (CRISPR-1 et CRISPR-2). (D) Même principe que pour le graphique (C) avec un autre milieu : HAT contenant de l'hypoxanthine, de l'aminoptérine et de la thymidine. (Source : Ruillier et al., 2020).

L'ajout d'une lignée KO HGPRT permet d'évaluer l'effet du ou des composés retenus à l'issue du criblage sur une lignée modèle de la MLN. Cela permettrait de voir si une molécule capable d'augmenter le pourcentage de progéniteurs dopaminergiques au sein des lignées « wild-type » a également un effet sur la population dopaminergique dans une lignée MLN.

Les résultats suivants concernent en première partie les travaux de recherche inclus dans l'article soumis en premier auteur. Ensuite, le développement réalisé autour du protocole est décrit dans une seconde partie.

1. Travaux de recherche inclus en partie dans l'article

1.1. Différenciation et miniaturisation des progéniteurs des nDA à partir de CSPh

Les résultats présentés ci-dessous sont ceux décrits dans la **Figure 1** de l'article.

Pour le criblage à haut débit le protocole adapté au format miniature est le suivant (Figure 39).

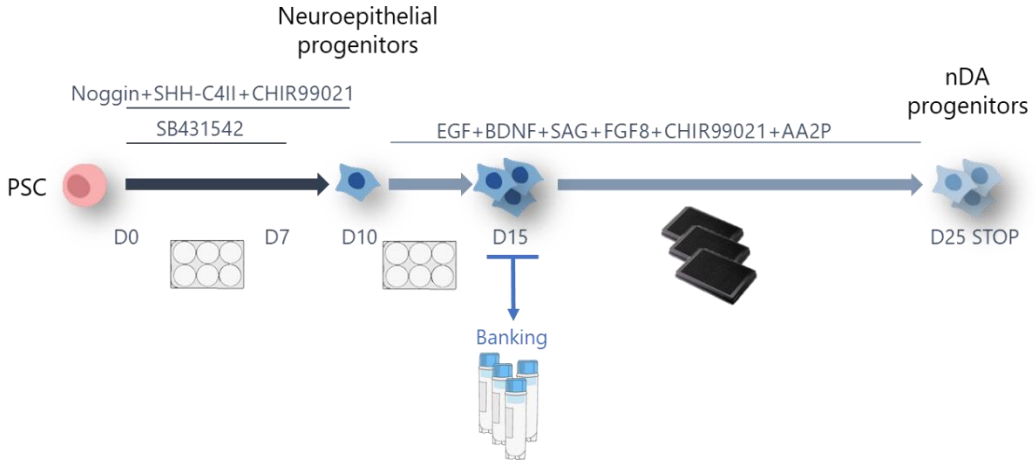


Figure 39 : Induction des progéniteurs dopaminergiques à partir de CSPh au format miniaturisé.

Schéma de la miniaturisation du protocole d'induction des progéniteurs des nDA. L'induction dure 25 jours avec une phase de spécification de 15 jours et 10 jours en microplaque. Les progéniteurs neuroépithéliaux sont ensemencés en microplaque à l'aide du BRAVO. Afin de limiter les temps de culture avant les futurs traitements, une étape de congélation des progéniteurs peut être réalisée à J15.

Les hiPSC (Figure 40A) ont été induites en agrégats sphériques en 3D (Figure 40B) eux-mêmes ensemencés jusqu'au jour dix du protocole. Le dixième jour, les progéniteurs neuroépithéliaux présents sous la forme de rosettes neurales (« cratères » visibles au microscope), ont été sélectionnés (Figure 40C). Ensuite les progéniteurs ont été cultivés dans le milieu de spécification des progéniteurs des nDA dans un premier temps en plaque 6 puits puis ensemencés au format microplaque adapté aux traitements HTS (Figure 39).

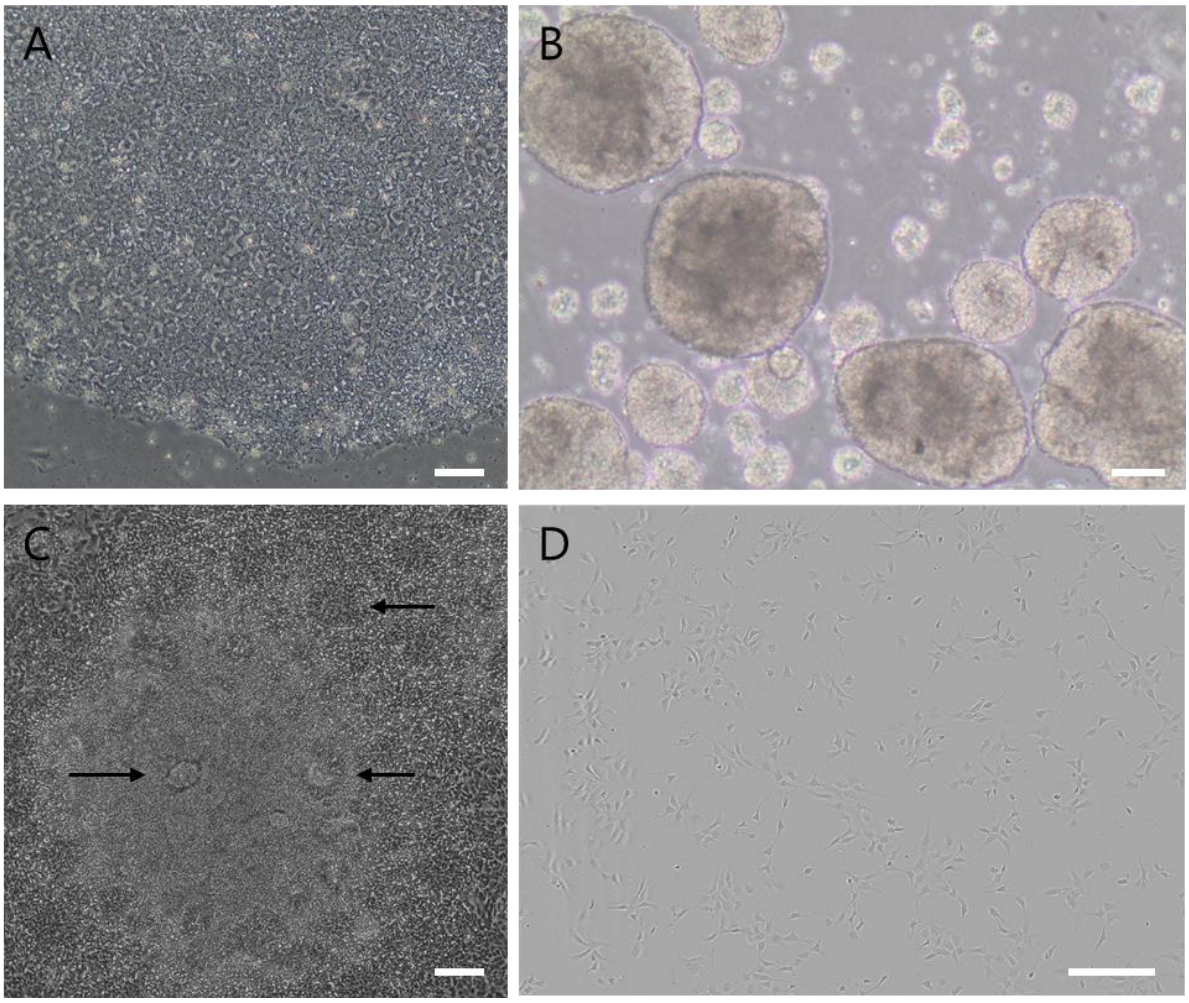


Figure 40 : Photos des différents types cellulaires au cours de l'induction.

(A) Colonie de CSPh avant induction. (B) Corps embryoïdes avant ensemencement sur PO-LAM et fibronectine à J4. (C) Progéniteurs neuroépithéliaux dans les « rosettes neurales » avant sélection à J10. (D) Progéniteurs neuroépithéliaux après ensemencement automatisé au BRAVO à J16 en microplaque. Barre d'échelle : 100µm pour (A), (B) et (C) ; 200µm pour (D).

L'automatisation de la culture permet l'ensemencement homogène des cellules à J15 (Figure 40D, 41A et 41B).

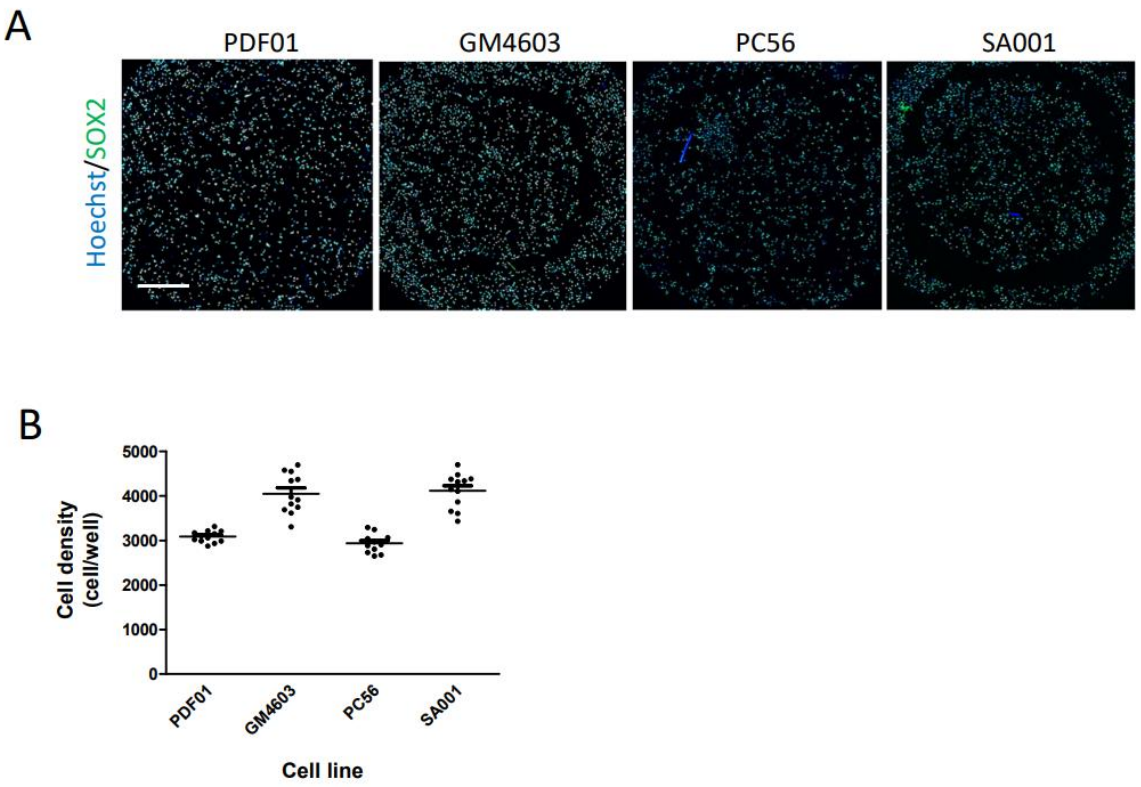


Figure 41 : Contrôle de la qualité de l'ensemencement après la distribution automatisée des cellules au BRAVO.

(A) Image représentative de la répartition des progéniteurs J25 à l'aide du distributeur de liquide automatisé BRAVO. Barre d'échelle = 200µm. (B) Quantification du nombre de cellules par puits. Chaque point représente un puits. N=12 puits par ligne. (Source : Figure S1A et S1B de l'article).

Après la phase d'amplification en microplaque, les cellules ont été fixées à J25 pour quantifier les populations des progéniteurs neuraux et dopaminergiques à l'aide de la plateforme d'imagerie à haut contenu CX7 qui permet grâce à des masques spécifiques de quantifier les marquages d'intérêt et leurs colocalisations (Figure 42).

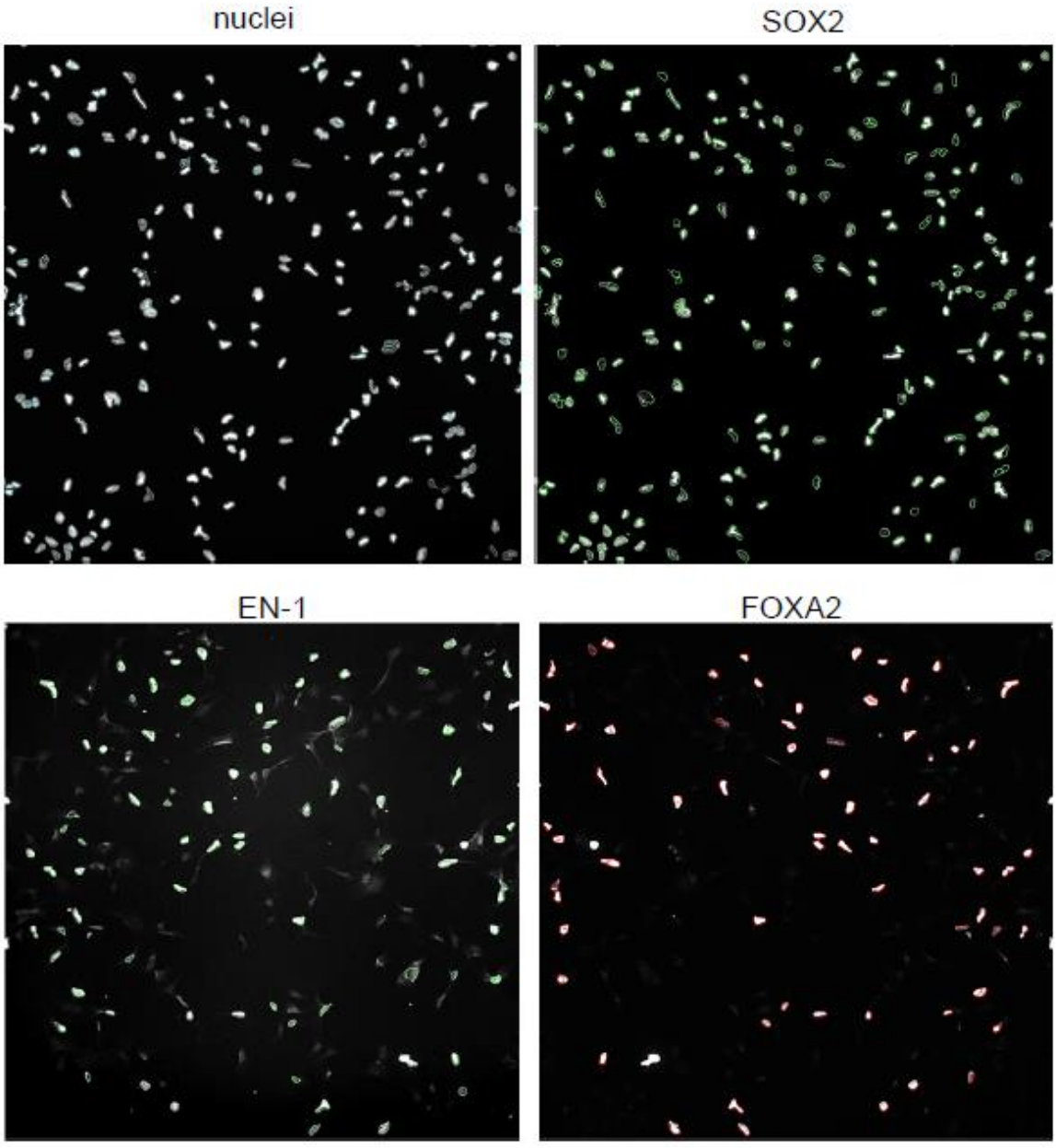


Figure 42 : Exemples de masques utilisés pour sélectionner les cellules exprimant les marqueurs d'intérêt : Hoechst, SOX2, EN-1 et FOXA2.

En haut à gauche, sélection des noyaux cellulaires à l'aide du marquage Hoechst (masque en cyan). En haut à droite, sélection des cellules exprimant le marquer SOX2 des progéniteurs neuraux (masque en vert). En bas à gauche, sélection des cellules exprimant le marqueur du mésencéphale EN-1 (masque en vert). En bas à droite, sélection des cellules exprimant le marqueur ventral FOXA2 (masque en rouge). (Source : Figure S1C de l'article).

Afin de contrôler la qualité de l'induction neurale, le pourcentage de SOX2 a d'abord été

quantifié (Figure 43B, Figure 1C de l'article). La majorité des cellules, entre 80 % et 100 %, exprime le marqueur SOX2. L'induction pendant 25 jours permet d'obtenir entre 25 % et 40 % de progéniteurs d'identité dopaminergique en fonction des lignées (Figure 43B, Figure 1C de l'article). On peut constater que les pourcentages de cellules exprimant EN-1 (marqueur du mésencéphale) sont équivalents à ceux des cellules exprimant la colocalisation EN-1+/FOXA2+ ce qui confirme l'identité ventrale des progéniteurs du mésencéphale, obtenus en fin de spécification. Les IF des progéniteurs des nDA du MV EN-1/FOXA2 et des progéniteurs SOX2 sont représentées dans la Figure 43A (Figure 1B de l'article).

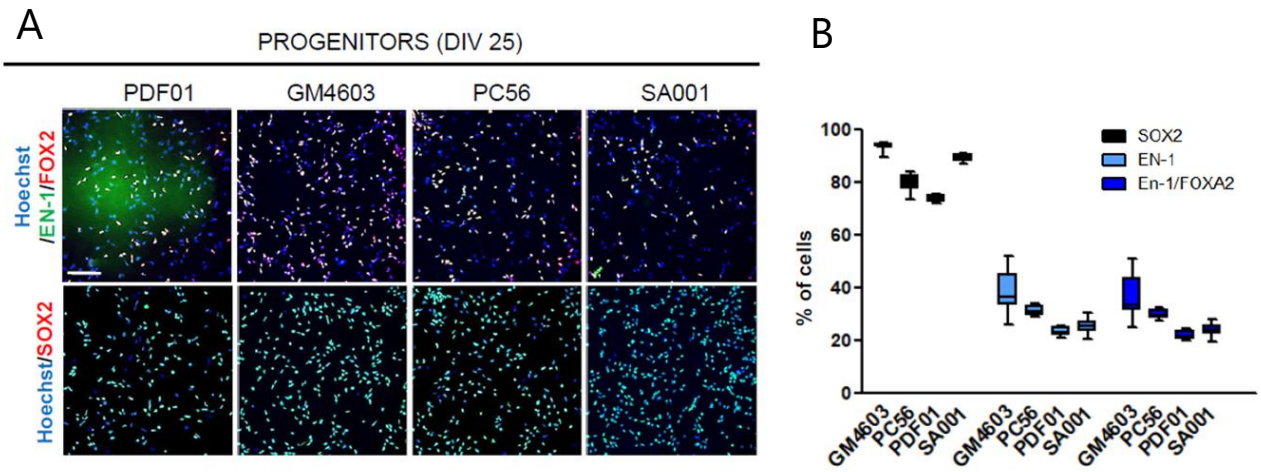


Figure 43 : Quantification de la proportion des marquages SOX2, EN-1 et FOXA2 dans les progéniteurs à J25.

(A) Immunofluorescence des progéniteurs neuraux exprimant SOX2 (rouge dans la légende, marquage vert sur les IF) et des progéniteurs des nDA du MV exprimant la colocalisation de EN-1 (vert) et FOXA2 (rouge). Barre d'échelle : 50µm. (B) Quantification du marqueur SOX2, et des populations EN-1+ et EN-1+/FOXA2+ à J25 chez les progéniteurs par rapport au nombre de cellules totales. N=12 puits par conditions. (Sources : (A) Figure 1B et (B) Figure 1C de l'article).

Une fois les progéniteurs du domaine dopaminergique obtenus, ils ont été poussés en différenciation terminale pendant 28 jours. Afin d'obtenir une quantité suffisante de cellules pour la différenciation terminale, la phase d'amplification de la spécification a été réalisée en flasque de culture selon le même protocole. Les progéniteurs ont ensuite été ensemencés de façon automatisée en microplaque pour la différenciation terminale pendant 28 jours (Figure

44A). A la fin des 28 jours, un peu plus de la moitié des cellules différenciées expriment les protéines HuC et HuD (Figure 44B et 44C, Figure 1D et 1E de l'article) spécifiques des neurones matures. Un peu plus de 20% des cellules totales expriment la tyrosine hydroxylase pour les lignées hiPSC PDF01 et 4603, ainsi que pour la lignée hESC SA001. En revanche on retrouve une dizaine de pourcent de cellules exprimant la TH chez la lignée PC056. Enfin, la majorité des cellules exprimant la TH exprime également l'AADC deuxième enzyme clé de la synthèse de la DA (Figure 44B et 44C, Figure 1D et 1E de l'article).

Des neurones co-exprimant les deux enzymes TH et AADC, enzymes clés de la synthèse de la DA, sont donc retrouvés au sein des différentes lignées cellulaires à la fin de la différenciation. Ceci confirme le potentiel des progéniteurs du domaine dopaminergique obtenus à la fin de l'induction à être compétents pour la différenciation en nDA, le tout au format miniaturisé nécessaire au criblage à haut débit à un temps précoce du développement.

Les taux de progéniteurs et de neurones DA retrouvés sont dans une gamme dynamique permettant d'identifier des molécules augmentant ou diminuant la neurogénèse dopaminergique et donc des voies potentiatrices ou inhibitrices de ce processus développemental.

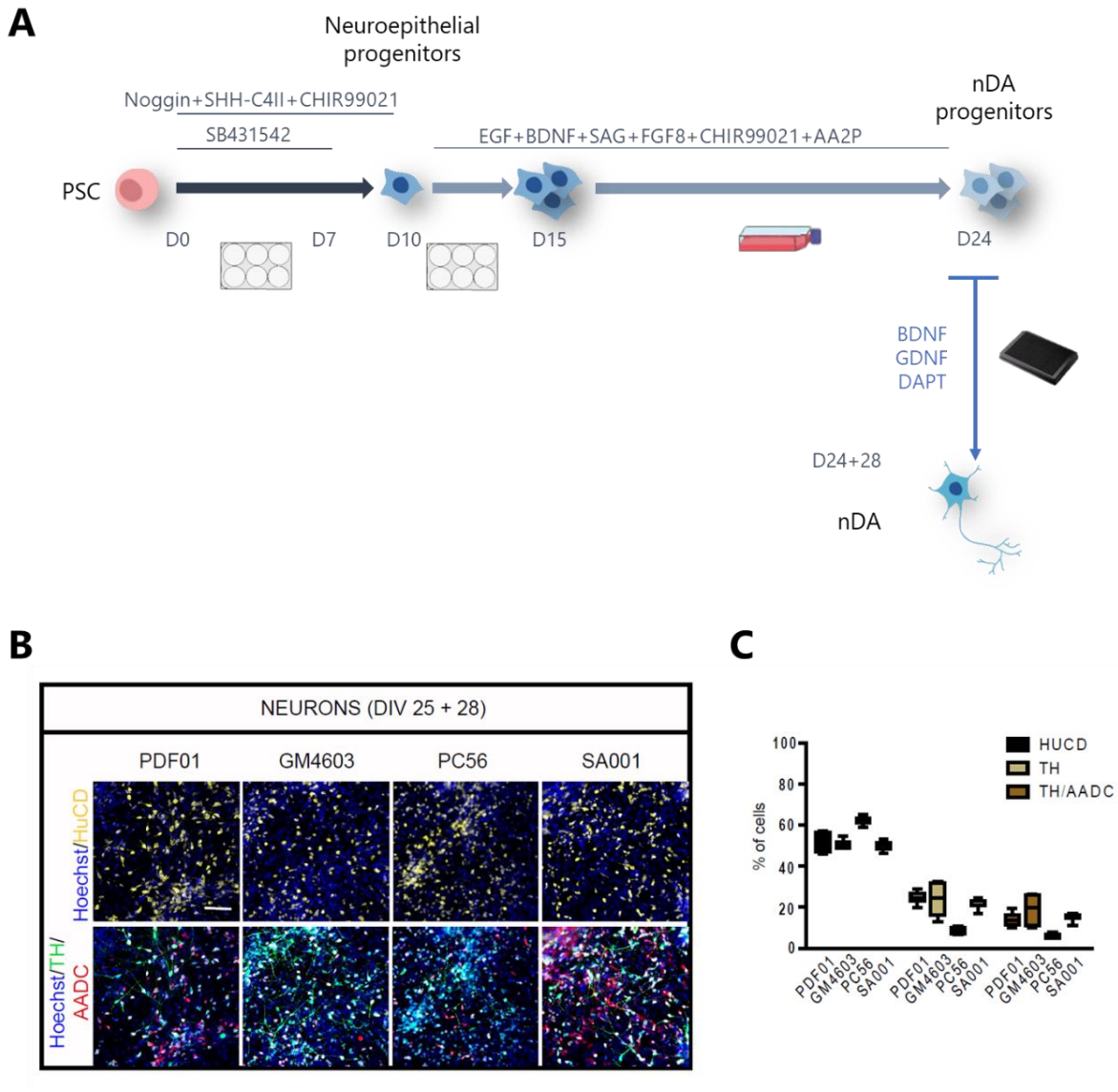


Figure 44 : Différenciation terminale pendant 28 jours des progéniteurs dopaminergiques J25 en nDA.

(A) Schéma du protocole de différenciation terminale des progéniteurs J24 en neurones dopaminergiques pendant 28 jours. La différenciation terminale a été effectuée en microplaque. (B) Immunofluorescence des marqueurs des neurones matures : HuCD (en jaune), et des nDA : neurones exprimant la TH (en vert) et l'AADC (en rouge). Barre d'échelle : 25µm. (C) Pourcentages de neurones (cellules HuCD+) dans chaque lignée après 28 jours de différenciation. Pourcentages de neurones exprimant la TH et la colocalisation TH/AADC par rapport au nombre de cellules totales. N=8 puits par conditions. (Sources : (B) et (C) Figure 1D et 1E de l'article).

1.2. Résultats du criblage primaire et sélection des hits primaires

Les résultats présentés dans cette partie sont ceux décrits dans la **Figure 2** de l'article.

Le criblage primaire a été réalisé en utilisant les progéniteurs induits à partir de la lignée hiPSC PDF01 selon le protocole présenté sur la Figure 45.

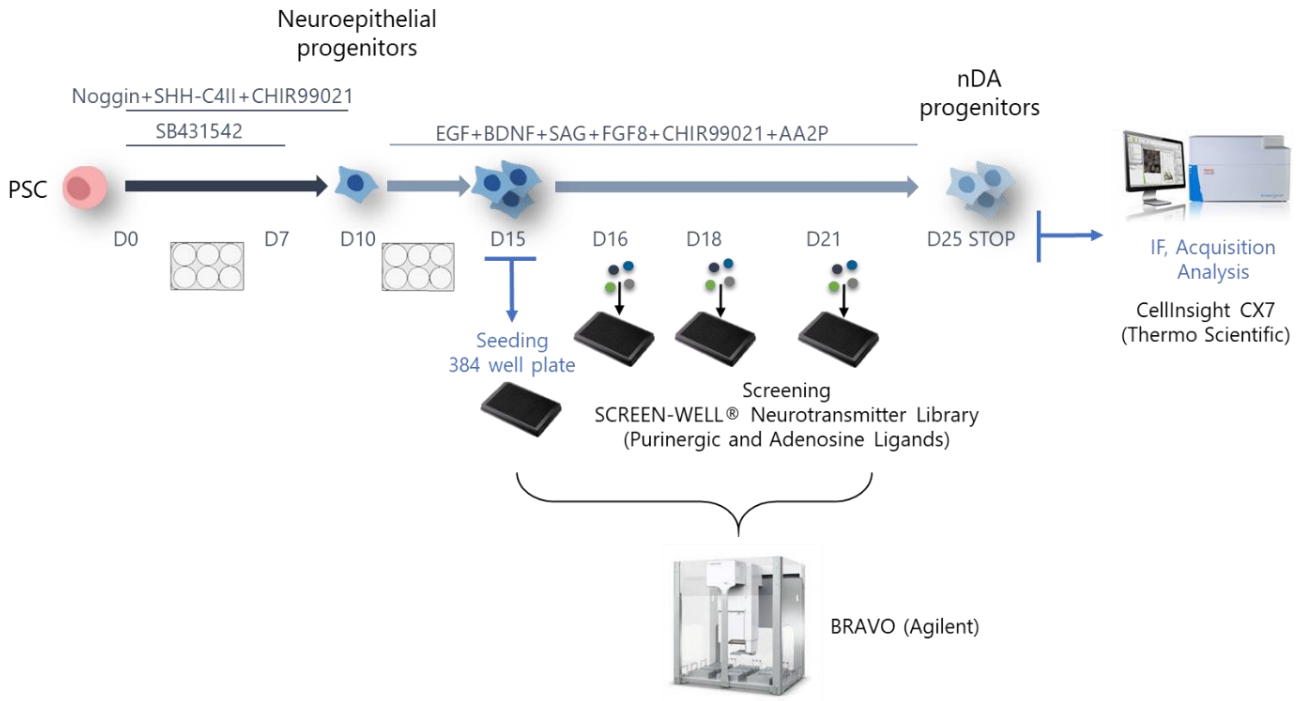


Figure 45 : Protocole du criblage primaire.

Schéma du protocole suivi pour le criblage primaire et les « retests » en DR. Les progéniteurs neuroépithéliaux ont été ensemencés en microplaque à J15 puis les traitements ont été effectués au robot à J16, J18 et J21. Les cellules ont été fixées à J25 pour quantifier les progéniteurs des nDA.

Au cours de ce criblage primaire 73 molécules de la banque SCREEN-WELL® Neurotransmitter Library de chez ENZO Life Science ont été testées lors des traitements. Ces composés sont des ligands purinergiques (inhibiteurs, agonistes ou antagonistes des Rc P2X et P2Y, agoniste ADP, analogue UTP ou encore agonistes endogènes) ou adénosinergiques (dérivés ou analogues de l'adénosine, agonistes ou antagonistes des Rc ADORA, inhibiteurs du transport ou de la recapture de l'adénosine). Parmi ceux-ci, on retrouve des agonistes et des

antagonistes des récepteurs purinergiques ou de l'adénosine, des neurotransmetteurs et également des molécules commercialisées en tant que médicaments (Tableaux S1 et S2).

Les hits primaires ont été sélectionnés en utilisant un calcul de Run Z-score et la viabilité cellulaire par rapport au contrôle N2B27 (sans traitement). Les molécules retenues avaient un Z-score supérieur à 1σ, soit une augmentation de plus de 50 % de la proportion de cellules EN-1+/FOXA2+ obtenue dans les conditions contrôles (DMSO ou H_2O), et ce avec une viabilité cellulaire supérieure à 70%. Les composés de la banque ont été testés à deux doses : 5µM et 20µM (Figure 46).

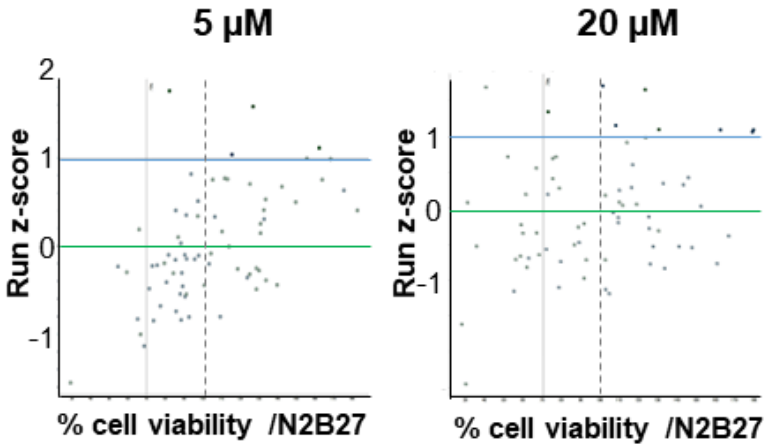


Figure 46 : Run Z-Score et viabilité cellulaire du criblage primaire à 5µM et 20 µM.

Dotplot représentant la sélection des hits du criblage primaire selon le pourcentage de viabilité par rapport au contrôle N2B27 et le RZS. La ligne horizontale verte indique le z-score=0 ; la ligne horizontale bleue le z-score=1 (limite de sélection des composés) et la ligne verte verticale, les 70% de viabilité.

(Source : Figure 2A de l'article).

Les six composés finalement retenus après le criblage primaire sont les composés 02, 08, 16, 47, 51, 67. Pour les composés repris dans le DMSO (02, 08, 16, 47 et 51), une augmentation du pourcentage des progéniteurs dopaminergiques est visible pour les composés 08, 47 et 51 aux deux concentrations (Figure 47). Pour les composés 02 et 16, le pourcentage des progéniteurs EN-1+/FOXA2+ est augmenté à 20µM par rapport à la condition contrôle DMSO (Figure 47). De façon générale, l'augmentation des progéniteurs EN-1+/FOXA2+ est plus

importante pour la dose de 20µM. Pour le composé 67, l'augmentation du pourcentage des progéniteurs dopaminergiques est équivalente et visible aux deux doses par rapport à la condition contrôle solvant (H_2O) (Figure 47).

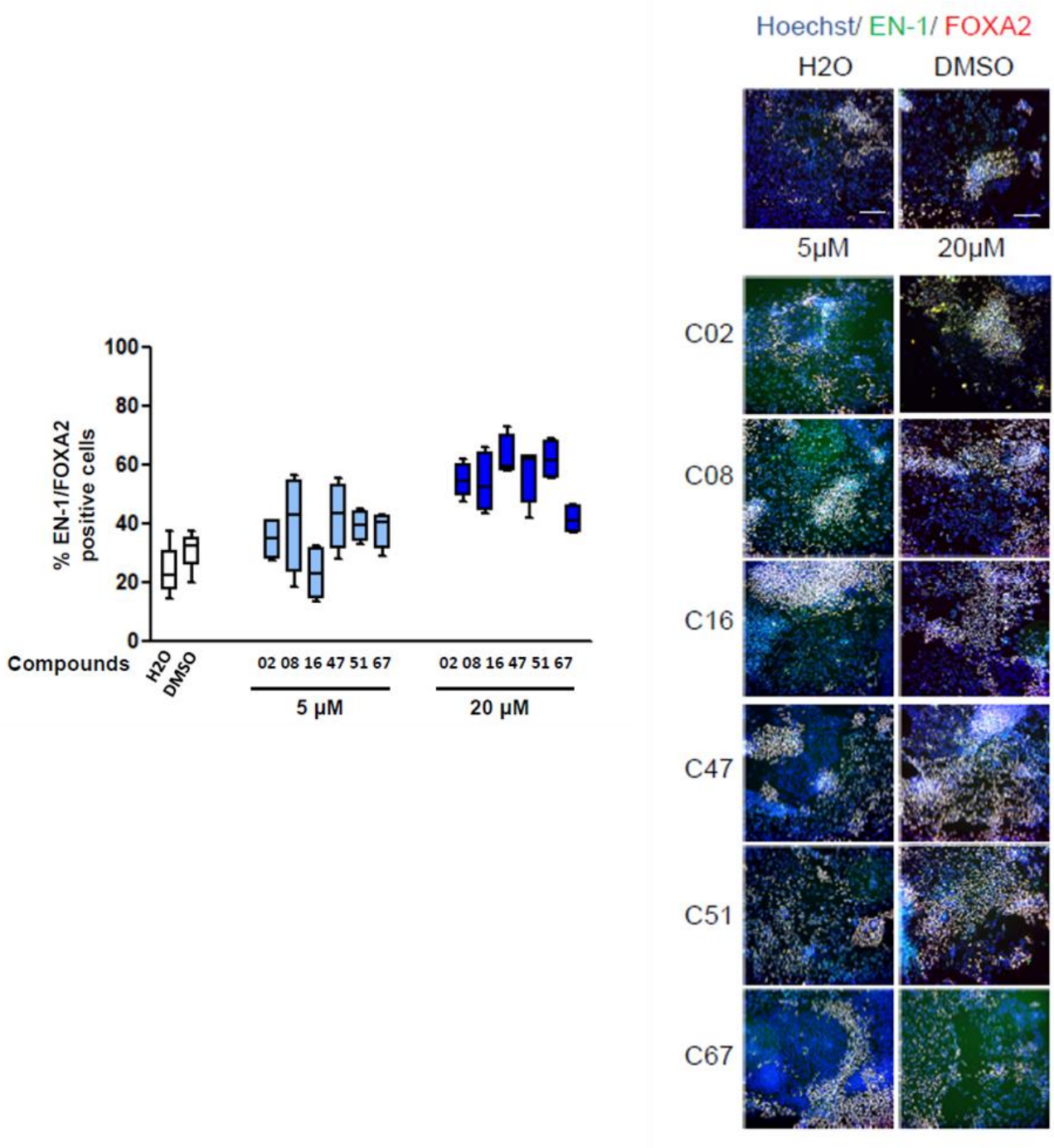


Figure 47 : Pourcentages des progéniteurs dopaminergiques EN-1+/FOXA2+ (J25) après traitements avec les hits primaires.

Sur la gauche : graphique des résultats du criblage primaire. Pourcentage des progéniteurs dopaminergiques (EN-1+/FOXA2+) à J25 par rapport au nombre total de cellules (hoechst) dans les

conditions contrôles (DMSO et H_2O) et traitées en fonction du composé et de la dose (N=4 puits par conditions). Sur la droite : IF des progéniteurs DA (jaune) exprimant la colocalisation des marqueurs EN-1 (vert) et FOXA2 (rouge). Barre d'échelle : 50µm. (Sources : Figure 2B et 2C de l'article).

Parmi les six hits primaires, on retrouve trois ligands de récepteur à l'adénosine : un agoniste, le C02, et un antagoniste, le C16, du Rc A1 ainsi qu'un agoniste du Rc A3 : le C08. On retrouve ensuite deux molécules analogues de l'adénosine, le C47 et le C51. Enfin, le composé 67 est un agoniste du récepteur aux purines P2Y4. Les caractéristiques des hits primaires sélectionnés sont résumées dans le Tableau 6 suivant.

cpd #	CAS #	compound name	annoted activity
2	96760-69-9	Adenosine amine congener	A1 adenosine agonist
8	152918-18-8	1-Deoxy-1-[6-[[(3-iodophenyl)methyl]amino] -9H-purin-9-yl]-N-methyl-β-D-ribofuranuronamide	A3 adenosine agonist
16	102146-07-6	8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine	A1 adenosine antagonist
47	15763-06-1	1-Methyladenosine	Adenosine analog
51	6736-58-9	3-Deazaadenosine	Adenosine analog
67	19817-92-6	Uridine-5'-triphosphate·3Na	P2Y4 agonist

Tableau 6 : Tableau des hits primaires issus du criblage sur la lignée PDF01.

Caractéristiques des hits primaires issus du criblage sur les progéniteurs induits à partir de la lignée hiPSC PDF01. Le tableau contient le numéro des composés, leur numéro CAS, leur nom et leur activité connue. (Source : Figure 2D de l'article).

1.3. Retests des composés en doses-réponses (DR)

Les résultats présentés ici sont ceux présentés dans la **Figure 3** de l'article.

Les six hits primaires ont ensuite été testés en doses-réponses sur la lignée PDF01 à nouveau. Pour évaluer la reproductibilité de l'effet, les « retests » ont également été effectués sur trois autres lignées cellulaires : la 4603 (hiPSC), la PC056 (hiPSC) et la lignée SA001 (hESC).

Les six molécules sélectionnées lors du criblage ont été recommandées suivant les numéros CAS indiqués dans les Tableaux S1 et S2 afin d'avoir une quantité suffisante de composés pour les DR. Le composé C02 a été recommandé chez ChemCruz® (Santa Biotechnologiy), de même que le C08, le C16 et le C51. Le C47 provient de chez Cayman Chemical et le C67 de chez Sigma-Aldrich®. Les « retests » ont été réalisés en quadruplicats avec les doses suivantes : 0,5µM, 1µM, 1,5µM, 2µM, 2,5µM, 5µM, 7,5µM, 10µM, 12µM, 15µM et 20µM (Figure 48).

Parmi les six composés, cinq ont été éliminés. Le C16 et le C67 n'ont pas reproduit l'augmentation des progéniteurs DA sur la lignée PDF01, ils n'ont donc pas été retenus. Pour trois autres composés, le C02, le C47 et le C51, on observe des effets doses-réponses mais ces effets ne sont pas reproductibles d'une lignée à l'autre (Figure 48).

Un seul composé, le C08 induit un effet dose-réponse sur le pourcentage de cellules EN-1+/FOXA2+ dans les quatre lignées utilisées (Figure 48).

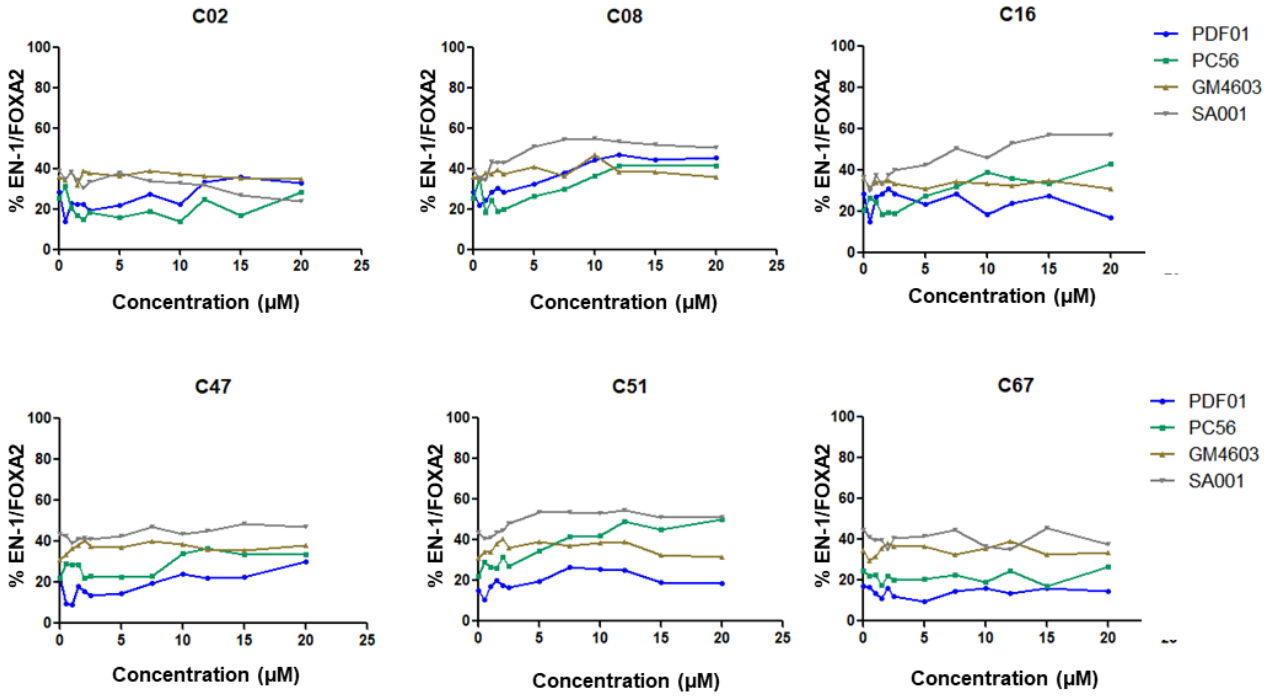


Figure 48 : Doses-réponses sur les quatre lignées « wild-type » avec les composés sélectionnés lors du criblage primaire.

Pourcentage des cellules exprimant les marqueurs des progéniteurs dopaminergiques EN-1+/FOXA2+ pour chaque composé dans les trois lignées hiPSC PDF01, 4603, PC056 et la lignée hESC

SA001. Le pourcentage est exprimé en fonction de la concentration du composé en µM. (Source : Figure 3A de l'article).

Le composé C08 a donc été conservé après les DR pour la suite. La dose de 10µM a été choisie pour les IF car c'est à partir de cette dose que le composé semble avoir un effet pour l'ensemble des lignées cellulaires (Figure 48). Les images des IF de l'effet du composé C08 à 10µM par rapport à la condition DMSO sur l'expression des marqueurs EN-1 et FOXA2 sont représentées dans la figure suivante (Figure 49).

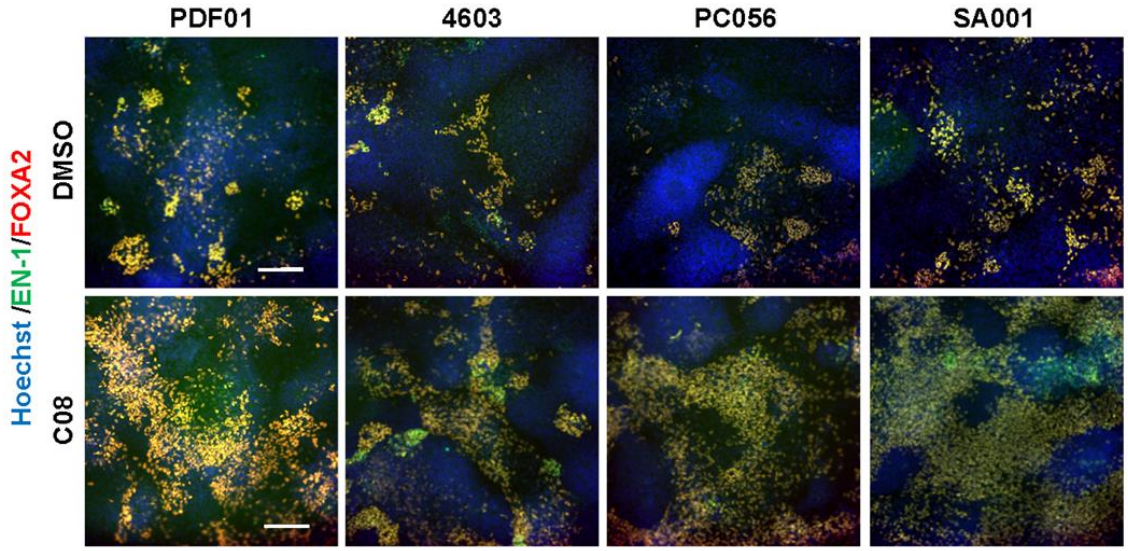


Figure 49 : Immunofluorescences des progéniteurs dopaminergiques à J25 avec et sans traitement avec le C08 à 10µM.

Images des immunofluorescences effectuées sur les progéniteurs dopaminergiques à J25 (en jaune) pour la condition contrôle DMSO et la condition avec traitement avec le C08 à 10µM. Les progéniteurs des neurones DA (en jaune) expriment la colocalisation des marqueurs EN-1 (vert) et FOXA2 (rouge) le tout par rapport aux noyaux totaux marqués au Hoechst (bleu). Barre d'échelle : 50µm. (Source : Figure 3B de l'article).

Le C08 (ou 1-Deoxy-1-[6-[[(3-iodophenyl)methyl]amino]-9H-purin-9-yl]-N-methyl-β-D-ribofuranuronamide) étant un agoniste du Rc à l'adénosine A3, afin de valider l'expression de celui-ci, des IF ont été réalisées sur les progéniteurs à J16. Ce jour a été choisi car il correspond au premier jour de traitement avec la banque de molécule dans le protocole de criblage.

L'expression validée du Rc ADOR3 pour les quatre lignées est représentée sur la Figure 50.

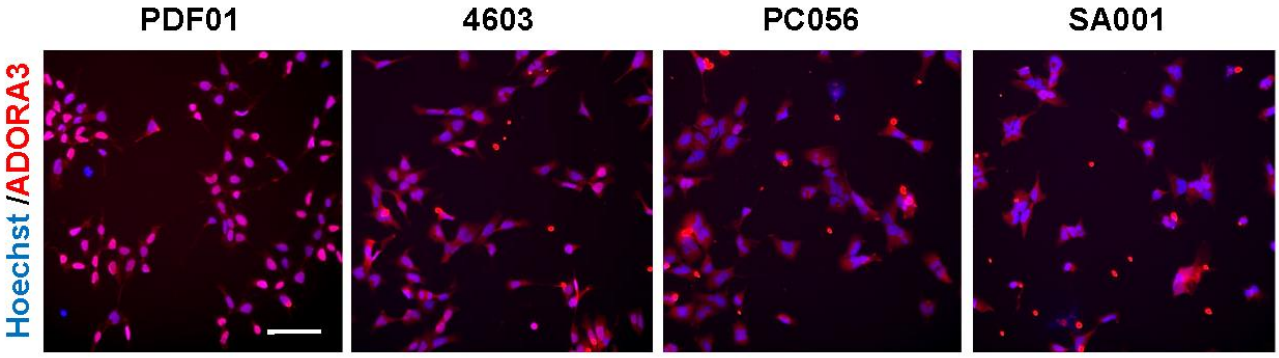


Figure 50 : Validation de l'expression du Rc A3 chez les progéniteurs neuroépithéliaux J16.

Images des immunofluorescences pour valider l'expression du marquage du Rc A3, cible du C08, effectuées sur les progéniteurs neuroépithéliaux à J16. Barre d'échelle 25µm. (Source : Figure 3C de l'article).

1.4. Validation du composé sur la différenciation terminale des lignées SA001 « wild-type » et éditée KO HGPRT

Les résultats présentés dans cette partie correspondent à ceux présentés dans la **Figure 4** de l'article.

Afin de confirmer l'effet du C08 sur le nombre de nDA obtenus, le composé a été testé à 10µM selon le même protocole sur trois clones de la lignée SA001 : deux clones « wild-type » et un clone CRISPR édité pour l'HGPRT utilisé comme modèle de la perte de l'HGPRT (Ruillier et al., 2020) (Figure 51A). Après 10 jours de traitement, la population dopaminergique a été quantifiée à J25 pour évaluer l'effet du composé sur la ligné éditée. Les progéniteurs traités ont ensuite été différenciés en neurones pendant 28 jours afin de quantifier le pourcentage de neurones résultants de la différenciation des progéniteurs dopaminergiques. Dans un premier temps, après 28 jours de différenciation on obtient entre 20 et 40 % de neurones totaux (cellules exprimant HuCD) en fonction du clone (Figure 51B). Comme les progéniteurs des clones « wild-type », les progéniteurs de la lignée éditée sont capables de se différencier en

neurones comme indiqué par la quantification d'HuCD. Il n'y pas de différence entre les conditions DMSO et avec traitement avec le C08 entre les différents clones. Le composé C08 ne semble donc pas avoir d'effet sur le nombre global de neurones (Figure 51B).

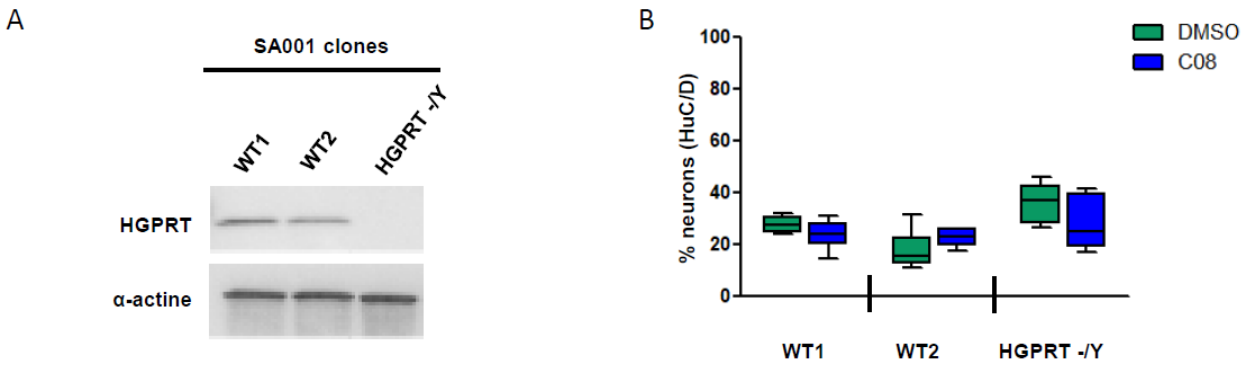


Figure 51 : Différenciation terminale en neurones des progéniteurs J25 à partir de la lignée SA001 « wild-type » ou éditée KO HGPRT au préalable traités ou non avec le C08.

(A) Western blot confirmant l'absence d'expression de l'enzyme HGPRT dans le clone édité. L'α-actine a servi de contrôle. (B) Pourcentage de neurones J28 par rapport au nombre total de cellules après 28 jours de différenciation à partir des progéniteurs dopaminergiques J25 traités ou non avec le composé C08. (Source : Figure 4A et AB de l'article).

Avant la différenciation, l'effet du composé 08 sur le pourcentage de progéniteurs dopaminergiques a été vérifié dans les trois clones de la lignée SA001 à J25. Tout d'abord, on observe que le pourcentage de progéniteurs EN-1+/FOXA2+ est plus faible pour la lignée HGPRT-/Y par rapport aux lignées non éditées, montrant que la perte de l'HGPRT entraîne la diminution du marqueur EN-1 (Figure 52). Après traitement avec le C08 à 10µM, on retrouve l'augmentation du pourcentage de progéniteurs du MV par rapport au contrôle DMSO dans les deux clones « wild-type » (Figure 52A et 52B). Enfin, lorsque traités avec le C08, on observe une augmentation significative des progéniteurs du MV dans la lignée HGPRT-/Y (Figure 52A et 52B).

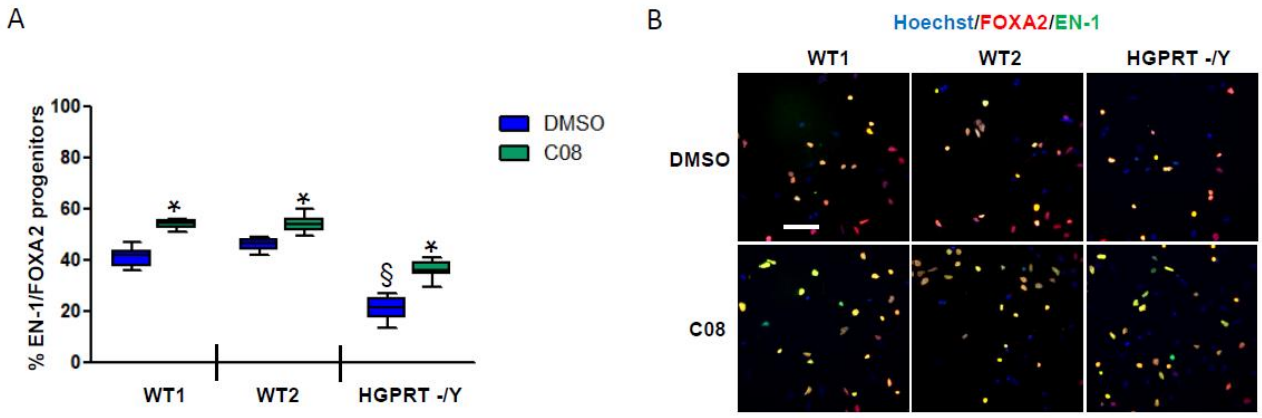


Figure 52 : Effet du C08 sur l'expression des marqueurs dopaminergiques chez les progéniteurs SA001 J25 « wild-type » et KO HGPRT avant différenciation terminale.

(A) Quantification du pourcentage de cellules EN-1+/FOXA2+ par rapport au nombre de cellules totales chez deux clones « wild-type » SA001 et un clone KO pour l'HGPRT édité à partir de la même lignée. Deux conditions sont comparées pour chaque clone, le contrôle DMSO et la condition avec composé à 10µM. N=8 puits par conditions. (B) IF des progéniteurs dopaminergiques (jaune) exprimant les marqueurs EN-1 (vert) et FOXA2 (rouge) dans les trois clones SA001 « wild-type » ou KO HGPRT avec et sans C08. Barre d'échelle : 25µm. (Source : Figure 4B et 4C de l'article).

Les progéniteurs traités avec le C08 à J25 ont ensuite été différenciés en neurones pendant 28 jours. Dans les conditions contrôles, on peut observer une diminution significative du nombre de neurones TH+/AADC+ dans le clone HGPRT-/Y par rapport aux clones « wild-type » (Figure 53A), ce qui corrèle avec la diminution observée au stade progéniteurs. Dans les conditions traitées avec le C08 on quantifie une augmentation significative des neurones TH+/AADC+ dans les clones non édités et le clone HGPRT-/Y (Figure 53A) par rapport à leur condition contrôle respective. On peut observer cette augmentation sur les IF des neurones dans la Figure 53B.

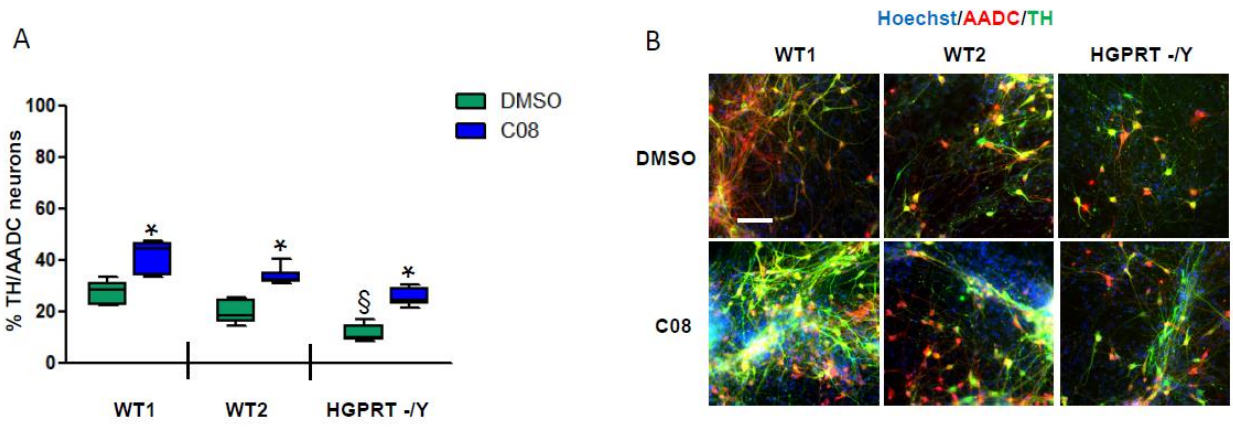


Figure 53 : Différenciation terminale des clones SA001 en nDA à partir des progéniteurs J25 traités ou non avec le C08.

(A) Quantification des neurones à J28 TH+/AADC+ (nDA) pour les clones SA001 et le clone SA001 KO HGPRT dans les deux conditions : DMSO et traités avec le C08. N=6 puits par conditions. (B) IF des neurones exprimant les marqueurs des nDA : TH (en vert) et AADC (en rouge) à J28 dans les conditions contrôles DMSO et traitées avec le C08. Barre d'échelle 25µm. (Source : Figure 4E et 4F de l'article).

Le criblage primaire et les « retests » en DR ont permis de sélectionner un composé potentiel, le C08, capable d'augmenter la spécification des progéniteurs dopaminergiques exprimant EN-1 et FOXA2 à partir du pool de progéniteurs du MV. De plus, si on compare les pourcentages de progéniteurs du MV et des nDA chez la lignée HGPRT-/Y pour la condition traitée avec le C08 à 10µM à ces mêmes pourcentages chez les clones « wild-type » non traités, on peut constater que le traitement avec le composé C08 semble restaurer le nombre de progéniteurs du MV et des nDA dans la lignée KO.

2. Article de recherche

Les travaux de recherche présentés dans la partie 1 des résultats ont fait l'objet d'un article soumis, intégré à la page suivante.

Identification of signaling pathways modifying the development of human dopaminergic neurons using a pluripotent stem cells-based high throughput screening automated system: Lesch-Nyhan disease and the purinergic pathways as a proof of principle

Marie Lasbareilles[1, 2, 3], Claire Boissart[1], Johana Tournois[4, 5], Laure Chatrousse[1], Thifaine Poullion[1] and Alexandra Benchoua[1, 4, *].

AFFILIATIONS:

[1] *Neuroplasticity and Therapeutics, CECS, I-STEM, AFM, 91100 Corbeil-Essonnes, France*
[2] *INSERM UMR 861, I-STEM AFM, 91100 Corbeil-Essonnes, France*
[3] *UEVE UMR 861, I- STEM AFM, 91100 Corbeil-Essonnes, France*
[4] *Research and technological innovation, CECS, I-STEM, AFM, 91100 Corbeil-Essonnes, France*
[5] *High throughput screening platform, CECS, I-STEM, AFM, 91100 Corbeil-Essonnes, France*

To whom correspondence should be addressed:
Alexandra Benchoua
CECS/ISTEM
28 rue Henri Desbruère-91100 Corbeil –Essonnes, France
abenchoua@istem.fr

Running title: Dopaminergic neuron genesis screening model.

Key Words: Neurogenesis, Purines, Lesch-Nyhan disease, dopamine, pluripotent stem cells, high throughput screening, drug discovery.

Abstract:
Perturbation of the development, maturation and projection of dopaminergic neurons has been proposed to contribute to several devastating neurological and psychiatric disorders. Understanding the signals modulating the genesis of human dopaminergic neurons is therefore crucial to elucidate disease etiology and identify counteracting measures to prevent them. In this study, we developed a screening model based on human pluripotent stem cells to identify modulators of dopaminergic neuron genesis. We set up a protocol of differentiation allowing to obtained floorplate midbrain progenitors competent to produce dopaminergic neurons and cultivated them into 384 well screening plates in a fully automated manner. This allowed treating these progenitors with collections of small molecules in order to identify compounds increasing dopaminergic neurons production. As a proof of principle, we screened a library of compounds targeting purine and adenosine dependent pathways. We identified an agonist of adenosine receptor 3 as a candidate molecule increasing dopaminergic neuron genesis in physiological conditions as well as in a model of Lesch-Nyhan disease. This screening model offers the opportunity to identify therapeutic molecules for a variety of disease affecting dopaminergic circuit development and plasticity at large throughput and to improve our knowledge of the etiology of these diseases.

INTRODUCTION

Midbrain dopaminergic (DA) neurons diffusely innervate several brain areas including the pre-frontal cortex, the limbic system and the basal ganglia. They play an important role in the control of multiple brain functions including voluntary movement and a broad array of behavioral processes such as mood, reward, addiction, and stress. Perturbation of the development, maturation and projection of DA neurons, which can occur from early postnatal phase to adolescence, has been proposed to contribute to many neurological and psychiatric disorders (Robbins 2003; Cai et al. 2021). This includes schizophrenia (Howes and Kapur 2009), bipolar disorders (Ashok et al. 2017), addiction (Hyman et al. 2006), depression (Grace 2016), attention-deficit/hyperactivity disorders (Gizer et al. 2009), autism spectrum disorders (Hamilton et al. 2013; Paval 2017) and compulsive disorders like Tourett's syndrome (Maia and Conceicao 2018). Understanding the signals modulating the genesis of human DA neurons is therefore crucial to elucidate mechanisms of disease emergence and progression and identify counteracting measures to prevent them. With this perspective, human pluripotent stem cells represent a valuable model allowing to assess systematically and agnostically the consequences of interacting with molecular pathway on the early events of DA neurons development, a stage that can be hard to access *in vivo*. Knowledge in developmental biology of midbrain DA neurons laid the foundation for their derivation from hPSC. The first key steps in the genesis of DA neurons are the early patterning events leading to the formation of the midbrain floorplate from the embryonic neural tube, which are controlled by the regionalizing factors Sonic Hedgehog (SHH), Wnt and Fibroblast Growth Factor 8 (FGF-8). The early midbrain floorplate cells, characterized by the co-expression of FOXA2 and OTX2, gives rise to different populations of progenitors that will migrates to their final location and produce different types of midbrain neurons including DA neurons but also interneurons, oculomotor neurons and red nucleus neurons. Specification of progenitors restricted to produce DA neuron progenitors starts with the expression of the homeobox gene Engrailed-1 (EN-1) which controls the DA neuron genetic program. The expression of Nurr1 and Pitx3 then promotes the further differentiation of DA progenitors into post-mitotic neurons. Finally, expression of the enzymes responsible for de synthesis of DA, namely the tyrosine hydroxylase (TH) and the aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC), signs the mature DA neurons identity. Midbrain DA neurons are ultimately located in the Substancia Nigra pars compacta (SNpc), which innervates the basal ganglia, and the Ventral Tegmental Area (VTA), which projects to the limbic system and the prefrontal cortex (Hegarty et al. 2013; Mesman and Smidt 2020). The methods of directed differentiation of PSC into DA neurons are based on these developmental principles. Most of them rely on mimicking the differentiation conditions described *in vivo* in animal models by using soluble morphogens and growth factors (Kirkeby et al. 2017; Parmar et al. 2020; Antonov and Novosadova 2021). This mainly consists in the sequential exposition of hPSC to SHH, WNT and FGF-8. However, since these factors are not specific of DA progenitors, but only dose dependently instruct the cells to adopt a midbrain floorplate regional identity, they usually lead to limited amount of authentic DA neurons mixed with undifferentiated progenitors and others types of midbrain neurons. However, what may be considered as a a drawback of current protocols actually offer the possibility to use these systems to increase our knowledge regarding molecular pathways specifically influencing DA progenitors and neurons genesis.

Here, we developed a high throughput screening system using hPSC to systematically assess the consequences of cell signaling pathway perturbations on the early events of DA neurons development. We first developed a protocol allowing differentiating and cultivating highly self-renewing midbrain floorplate progenitors that can be harvests to constitute frozen cell banks. Upon thawing, the progenitors are seed into 384 well plates in an automated manner in order to

be treated with small molecules targeting specific cell signaling pathways. As a proof of principle, we focused our interest on purine metabolism, considering the emerging knowledge of an instrumental role of purine in brain development (Fumagalli et al. 2017). We screened a library of compounds targeting purine and adenosine dependent pathways and identified an agonist of adenosine receptors as a candidate molecule. The activity of this molecule was evaluated in physiological conditions, as well as in a model of Lesch-Nyhan disease, a disorder due to the impairment of purine salvage pathway induced by hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HGPRT) loss of function mutation and characterized by abnormal development of DA neurons (Lloyd et al. 1981, Ernst et al. 1996, Torres and Puig 2015).

MATERIAL AND METHODS

Pluripotent stem cells

Three iPSC lines, reprogrammed from fibroblasts were used in this study. All cell lines details are summarized in Table S1. Somatic cell reprogramming was performed using the four human genes OCT4, SOX2, c-Myc and KLF4 cloned in Sendai viruses (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) and pluripotency characterized according to Takahashi et al. (Takahashi et al. 2007). In addition to iPSC, the control hESC line SA001 (Cellartis, Goteborg, Sweden) was used under the supervision of the French Bioethics Agency (Agreement number NOR AFSB 12002 43S). PSC lines were maintained in StemMACS iPS-Brew XF medium (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), supplemented with 1:100 penicillin/streptomycin (Gibco, Grand Island, NY, USA) and vitronectin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) as a matrix. The medium was changed every other day and the cells were manually passaged once a week. Cell cultures were incubated in a 37°C humidified atmosphere with 5% CO2.

Protocol of differentiation of midbrain progenitors

PSC differentiation protocol into midbrain progenitors is summarized in Figure 1. To start neural induction, PSC were collected and embryonic bodies (EBs) formed using low attachment 6 well plates in N2B27 medium (DMEM/F12:Neurobasal (1:1), N2 supplement (1:100), and B27 supplement without vitamin A (1:50)) containing: human recombinant Noggin (100 ng/ml, Peprotech, London, UK), SB431542 (10µM, Tocris Biosciences, Ellisville, Missouri, USA), SHH-C24II (500 ng/ml, R&D System, Minneapolis, MN, USA), CHIR99021 (0.8µM, Miltenyi Biotec.) and the Rock inhibitor Y27632 (10 ng/ml, Sigma-Aldrich, USA). Cell density at day 1 was 600,000 cell/well. Medium was refresh at day 2 and Y27632 removed. After 4 days, EBs were seeded on culture dishes coated with Poly-D-ornithin, Laminin and Fibronectin (PoLF) in the same medium containing Y27632 at 10 ng/ml. At day 10, neural rosettes were manually collected under binocular observation and seeded in plastic wares coated with PoLF in N2B27 medium containing: Epidermal Growth Factor (EGF, 10ng/ml, Peprotech), FGF-8 (100ng/ml), Peprotech), Brain-derived Growth Factor (BDNF, 20ng/ml, Peprotech), CHIR99021 (0.8µM), the Smoothened Agonist SAG (500nM, Millipore, Billerica, MA, USA) and Ascorbic Acid di-Phosphate (AA2P, 0.2mM, Sigma-Aldrich, Missouri, USA). This medium was considered as midbrain progenitor amplifying medium. Y27632 was added at plating. Medium was changed every other day and expanding progenitors passed at confluency using trypsin-EDTA in Y27632 containing medium. At day 15, progenitors can be freeze in a DMSO/Fetal calf serum freezing medium (10%/90%). At day 15, cells were seeded in PoLF coated 384 well plates in midbrain progenitor amplifying medium at a density of 20,000 cell/cm^2 until day 25 with medium change every other day. Neuronal differentiation was started by plating day 25 progenitors at a density of 35,000 cells/ cm^2 in 384 well-plates coated with PoLF in N2B27 medium containing: BDNF (20ng/ml), Glia-Derived Growth Factor (GDNF, 10ng/ml,

Peprotech) and the γ-secretase inhibitor DAPT (1µM, Tocris, Bristol, UK). Medium was changed twice a week.

High-throughput drug screening assay and hit selection

To conduct high throughput screening, day 15 progenitors were thawed and plated into PoLF treated 384-well plates at 25,000 cells per cm^2 in progenitor amplifying medium with Y27632 and without antibiotics using the Biocel 1800 liquid handling platform (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Cells were treated with the chemical libraries SCREEN-WELL® Purinergic ligand library (Enzo Life science, Villeurbanne, France, Table S2). Compounds were added at day 16, 18 and 21 at 5 or 20 µM in quadruplicates. DMSO and H2O were used as control. At day 25, cell were fixed using 4% PFA and processed for immunostaining.

Immunostaining and high content image analysis

Cells were fixed using 4% PFA (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) and incubated overnight at 4°C with primary antibodies (Table S3) diluted in blocking buffer composed of 1X PBS, 1% BSA and 0,3% Triton X-100 (both from Sigma-Aldrich). Cells were washed three times in PBS, and incubated 45 min at RT with Alexa Fluor conjugated secondary antibodies (Thermo Scientific). At last, the cells were washed three times in PBS. In addition, Hoechst 33228 (1:3000, Sigma) nuclear staining was performed during secondary labeling. Automated, unbiased image acquisition and analysis was performed using the high-content analysis system Cellinsight HCS CX7 from Cellomics (Thermofisher Scientifics, Les Ulis, France). Cellular parameters were collected and quantified using HCS studio software.

Compound selection and statistics

For selection of hit compounds in primary screening, Z-score (Curtis et al. 2016) was calculated, which is defined as $Z = (x-\mu)/\sigma$, where x is the percentage of EN-1/FOXA2 cells for an individual compound, µ is the mean percentage of EN-1/FOXA2 cells of all test compounds, and σ is the standard deviation of all test compounds. A compound with a minimum Z-score of 1.0 was considered a candidate compound.

For intergroup multiple comparisons during hit secondary screening and validation, PRISM software (Graphpad, San Diego, CA, USA) was used to conduct ANOVA statistical comparison analysis followed by Bonferroni post-hoc tests post. A p value <0.01 was considered statistically significant.

CRISPR/Cas9 gene edited HGPRT -/Y cells

HGPRT gene knock-out cells were generated from the male hESC control line SA001 using CRISPR/Cas9 mediated genome editing as described in (Ruillier et al. 2020). Protein knock-out was regularly check by western-blot analysis using HGPRT primary antibody and Actin was used as a loading control (Table S3).

RESULTS:

Differentiation of pluripotent stem cells into midbrain progenitors competent to produce dopaminergic neurons in a high throughput-screening format.

Our objective was to set up a model of developing DA progenitors derived from hPSC cultivable in high throughput miniaturized formats in order to test the effect of hundreds of experimental conditions in parallel. One of the key prerequisite was to obtain robustly and reproducibly a population of neural progenitors with the potency to produce DA neurons, that can be amplified to constitute frozen banks usable as a starting point to conduct high throughput

screening campaigns. To achieve this goal, we modified existing protocol to obtain a population of progenitors that self-renew while maintaining the competency to produce DA neurons, in a range compatible with revealing compounds that increase or decrease the efficacy of conversion of these progenitors into the DA lineage. hPSC were exposed to a cocktail of SMAD inhibitors to engage neural differentiation while the two regionalizing factors SHH-C24II and CHIR99021 were used to promote ventral midbrain fates (Kirkeby et al. 2012; Kirkeby et al. 2017). At day 10, we collected neural stem cells and further amplified them until day 15. The culture medium was modified accordingly to induce proliferation of the progenitors while maintaining their regional fate. To promote progenitors self-renewal in a niche-independent manner we used a combination of EGF + FGF (Boissart et al. 2013; Conti et al. 2005). FGF-8 was used instead of FGF-2 to support the caudal fates. SAG and CHIR were used to maintain cellular fate. AA2P was added to support the metabolic needs associated with intensive self-renewal (Figure 1A). Banking of the progenitors was performed at day 15. Upon thawing, we seeded the progenitors into 384 well plates using a liquid handling automated platform. Progenitors were further cultivated until day 25 in the same medium. At day 25 we analyzed progenitors fate using HCA. In parallel, a fraction of these progenitors were terminally differentiated as post-mitotic neurons in a medium containing, BDNF, GDNF for 28 days. The Notch inhibitor DAPT was added the 2 first days (Figure 1A). The process was repeated in parallel with 4 different hPSC lines (3 induced pluripotent stem cells lines and 1 embryonic stem cells line, Table S1). Progenitors cells recovered optimally upon thawing at day 15. Upon automated high throughput seeding, they homogeneously spread into the wells of the plate allowing accurate evaluation of cell markers expression using the HCA algorithms (Figure S1). After 25 days of culture, cell density was comprised between 3000 and 4000 cell/well of a 384 well plate (Figure S1). The majority of the cells expressed the neural marker SOX2 indicated a homogenous engagement into the neural lineage (Figure 1B and 1C). Depending of the cell line, the percentage of cell expressing the DA progenitor marker EN-1 was comprised between 25 and 40% of the population. Most of the EN-1 cells co-expressed the floor plate marker FOXA2 confirming their belonging to the midbrain floor plate region (Figure 1B and 1C). Upon 28 days of differentiation into the neuron-inducing medium, half of the population actually expressed the post-mitotic marker HuC/D (Figure 1D and 1E). Neurons co-expressing TH and AADC enzymes were detected in cultures derived from all the four cell lines indicated the correct potential of EN-1 progenitors at producing mature DA neurons (Figure 1D and E). Together, we obtain a robust and reproducible protocol allowing to obtain progenitors competent to produce DA neurons in a range compatible with studies aiming at identifying factors increasing the genesis of DA progenitors at the most early stages.

Primary screening of compound library

Cultures of midbrain progenitors in 384 well plate were used further to screen at high throughput and in an automated manner a collection of 73 compounds targeting purine and adenosine dependent pathways (Figure 2, Table S2). The primary screening was performed using the PDF01 hiPSC line. Day 15 midbrain progenitors were seeded in 384 well-plates. Cells were treated with compounds at 5 and 20 µM at each medium change between day 15 and day 25 in quadruplicates (Figure 2A). At day 25, cell were fixed and expression of EN-1 and FOXA2 positive cells quantified using automated high content image-based analyses. To select hit compounds, two criteria were chosen. First, cell viability, as assessed using Hoechst DNA labelling, should have been be above 70% of the cell viability measured in wells treated with vehicle only, i.e. H2O or DMSO. Second, raw quantification of EN-1/FOXA2 was converted into run z-score to allow standardized comparison of compounds between different plates (Curtis et al. 2016). We select compounds with a run z-score above 1, corresponding to a raw

increase of more than 50% of the proportion of EN-1/FOXA2 cell when compared with H2O or DMSO. Six compounds were selected at the end of this primary screening (Figure 2A). C08, C47, C51, C67 were efficient from 5 µM when C02 and C16 demonstrated efficiency only at 20µM. For every compound, at the most efficient concentration, the percentage of EN-1/FOXA2 cell were above 45% of the total cell number in the well. This percentage of EN-1/FOXA2 progenitors was comprised between, 23 and 30% in wells treated with H2O or DMSO confirming the increase of at least 50% compared to control conditions (Figure 2B and 2C). Annotated activities of these selected compounds indicated that adenosine dependent pathways were mainly involved since C02, C08 and C16 targeted adenosine receptors while C47 and C51 were described as adenosine analogues. C67 compound was described as an agonist of P2Y4 receptors (Figure 2D).

Evaluation of the robustness and repeatability of the selected compound activity

The six compounds were then tested in dose-response experiments to evaluate repeatability across experiments. Next to retesting on PDF01, each compound was also evaluated using the 3 others hPSC lines PC56, GM4603 and SA001 to evaluate the robustness of their activity in different cell lines (Figure 3A). Two compounds, C16 and C67, failed to demonstrate a dose-dependent activity when retesting on PDF01. When robustness was evaluated by replicating the experiment on the three other cell lines, three other compounds were excluded. C02, C47 and C51 did not demonstrated a robust effect across cell lines when quantifying the percentage of EN-1/FOXA2 cells. This retesting approach end-up selecting only one candidate compound that exhibit a strong dose –dependent activity on every cell lines tested. C08, an agonist of adenosine A3 receptor, was therefore further investigated (Figure 3A ad 3B).

Evaluation of C08 activity in a physiological context and in a Lesch-Nyhan disease model

We first confirmed that ADORA 3 protein, the physiological target of C08, was expressed in day 15 midbrain progenitors isolated from the 4 PSC lines (Figure 3C). We next chose to investigate C08 efficacy at increasing the genesis of DA progenitors and neurons in physiological conditions and in a disease model. We therefore chose to test C08 in 2 clones of Wt hESC SA001 line and in one clone of SA001 invalidated for HGPRT gene using CRISPR/Cas 9, a model of Lesch-Nyhan disease (Ruillier et al. 2020, Figure 4A). The 3 clones were differentiated side by side and, at day 25, the proportion of EN-1/FOXA2 progenitors was quantify. This indicated that, as described in the literature, HGPRT loss of activity was associated with a decreased number of EN-1 positive progenitors (Figure 4C and 4D). Day 25 progenitors were then harvested and further differentiated as post-mitotic neurons for 28 days. When compared to WT SA001 clones, HGPRT -/Y progenitors conserved their ability to produce post-mitotic neurons, as assessed using HuC/D pan-neuronal marker but quantification of the co-localized expression of TH and AADC enzymes in HuC/D positive neurons indicated that HGPRT -/Y progenitors produced less DA neurons than their WT counterparts (Figure 4E and 4F). We then treated the progenitors with 10 µM of C08 at each medium change between day 15 and 25. Repeated treatment with C08 significantly increased the percentage of cells expressing EN-1/FOXA2 in WT and in HGPRT -/Y cells (Figure 4C and 4D, Bonferroni post-hoc tests p-value <0.01). In agreement with the finding that C08 significantly increased EN-1/FOXA2 progenitor proportion, it also significantly increased the proportion of mature DA neurons both in WTs and in HGPRT -/Y SA001 cultures. Interestingly, treatment with C08 is sufficient to correct DA neurons deficiency associated with HGPRT loss of function that is restored at the same level than WT cells in this cellular model (Figure 4E and 4F, Bonferroni post-hoc tests p-value <0.01).

DISCUSSION

In this study, we developed a screening model based on iPSC derived neural stem cells to identify modulators of human DA neurons differentiation. The screening cascade identified C08, also known as IB-MECA, an A3 adenosine receptor (A3R) agonist, as a robust promotor of the very early stages of DA neuron genesis both in physiological conditions and in a LND PSC-based model. To date, four types of adenosine receptors have been identified and characterized. These receptors are G protein-coupled receptors that modulate the adenylyl cyclase dependent signaling pathways. A3R couple to Gi/Gq. Upon receptor binding to its agonists, Gi protein inhibits the adenylate cyclase, blocking the conversion of AMP into cAMP and inactivating Protein Kinase A (PKA). In addition, Gq protein acts on signaling pathways regulated by Phospholipase C, PI3 kinase and MAP Kinase. A3R can therefore modulate a large variety physiological functions. In the adult brain, expression of A3R have been reported in the thalamus, hippocampus, cortex, and retinal ganglion cells, as well as at motor nerve terminals and the pial and intercerebral arteries. A3ARs are also expressed in microglia and astrocytes (Borea et al. 2017). Pharmacological modulation of A3R influence the evolution of the brain damages following cerebral ischemia or traumatic injuries (Melani et al. 2014; Bozdemir et al. 2021). A3R are also involved in the development of neuroinflammation (Farr, Cuzzocrea et al. 2020) and the control of pain (Janes et al. 2016). To date, expression of A3R expression and their involvement during brain development is not well documented. Our data suggest that A3R dependent pathways maybe involved in DA neurons genesis. Inhibition of adenylate cyclase, reduction in cAMP and PKA inhibition could lead to an increase in glycogen synthase kinase-3 stability and downregulation of beta-catenin, 2 key molecules involved in the specification of DA progenitors (Fishman et al. 2002, Kirkeby et al. 2012). Interestingly, inhibition of adenylate cyclase also results in increased levels of intracellular AMP content pointing at adenosine-derived metabolites as important metabolic modulators of the homeostasis of dopaminergic circuits development. In LND, alteration of purine salvage pathways caused by loss of function of the HGPRT enzyme deregulates genes involved in early neuronal development (Torres and Puig 2015; Dinasarapu et al. 2022; Witteveen et al. 2022). In a LND iPSC-derived neural stem cell model, we previously reported the therapeutic potential of adenosine-like molecules and more particularly of s-adenosyl methionine (SAMe, Ruillier et al. 2020). We demonstrated that the protective effect of SAMe was accomplished via its conversion into AMP. The finding that IB-MECA corrected deficits associated with HGPRT deficiency in LND DA progenitors supported further the hypothesis that increasing AMP levels represent an interesting target to develop treatment for LND. Several agonists of A3R have been developed into druggable molecules offering the possibility of repurposing for LND (Fishman 2022).

Interestingly, our screening model helped selecting small molecules increasing the efficacy of conversion of PSC into DA progenitors, a strategy investigated for decade as a cell therapy product for Parkinson's disease. Several protocols were described in the literature to produce DA progenitors with the goal of replacing lost neurons in PD patients that mainly use growth factor based directed differentiation (Antonov and Novosadova 2021). However, these protocols still demonstrated flaws since they do not provide the sufficient specificity for obtaining the ventral midbrain DA neurons, as floorplate progenitors also generate other types of neurons. Consequently, authors reported low DA neuron yields with a large range of variability between cell lines and batch of differentiation (Kee et al. 2017; Kirkeby et al. 2017; Kim et al. 2021). Our screening model may therefore be useful to identify small molecules improving the amount and the specificity of the neurons produced as well as improving standardization of the differentiation protocols. Increasing the proportion of mature authentic

DA neurons may unlock the possibility of drug screening for late neurodegenerative diseases, like PD, or psychiatric disorders affecting the homeostasis of DA circuit.
Our screening tool can be replicated with iPSC of patients with defined clinical profiles opening the path to phenotypic disease modeling. It offers the opportunity to identify therapeutic molecules for a variety of disease affecting DA circuit development and plasticity being agnostic of the molecular mechanisms involved in disease emergence and progression. This is of particular interest for rare diseases or for multifactorial frequent diseases (Benchoua et al. 2021). It should also help identifying disease modifying pathways and gene of vulnerability at large throughput using, for example, CRIPSR/CAS-based whole genome screening to improve our knowledge of disease etiology (Nishiga et al. 2021). Together, this can help stratified patients to achieved personalized medicine and support the development of pharmacogenetics and pharmacogenomics to predict patient's response to drug therapy (Pardinas et al. 2021, Liu et al. 2022).

REFERENCES

Antonov, S. A. and E. V. Novosadova (2021). "Current State-of-the-Art and Unresolved Problems in Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Dopamine Neurons for Parkinson's Disease Drug Development." Int J Mol Sci **22**(7).

Ashok, A. H., T. R. Marques, S. Jauhar, M. M. Nour, G. M. Goodwin, A. H. Young and O. D. Howes (2017). "The dopamine hypothesis of bipolar affective disorder: the state of the art and implications for treatment." Mol Psychiatry **22**(5): 666-679.

Benchoua, A., M. Lasbareilles and J. Tournois (2021). "Contribution of Human Pluripotent Stem Cell-Based Models to Drug Discovery for Neurological Disorders." Cells **10**(12).

Boissart, C., A. Poulet, P. Georges, H. Darville, E. Julita, R. Delorme, T. Bourgeron, M. Peschanski and A. Benchoua (2013). "Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening." Transl Psychiatry **3**: e294.

Borea, P. A., S. Gessi, S. Merighi, F. Vincenzi and K. Varani (2017). "Pathological overproduction: the bad side of adenosine." Br J Pharmacol **174**(13): 1945-1960.

Bozdemir, E., F. A. Vigil, S. H. Chun, L. Espinoza, V. Bugay, S. M. Khoury, D. M. Holstein, A. Stoja, D. Lozano, C. Tunca, S. M. Sprague, J. E. Cavazos, R. Brenner, T. E. Liston, M. S. Shapiro and J. D. Lechleiter (2021). "Neuroprotective Roles of the Adenosine A(3) Receptor Agonist AST-004 in Mouse Model of Traumatic Brain Injury." Neurotherapeutics **18**(4): 2707-2721.

Cai, Y., L. Xing, T. Yang, R. Chai, J. Wang, J. Bao, W. Shen, S. Ding and G. Chen (2021). "The neurodevelopmental role of dopaminergic signaling in neurological disorders." Neurosci Lett **741**: 135540.

Conti, L., S. M. Pollard, T. Gorba, E. Reitano, M. Toselli, G. Biella, Y. Sun, S. Sanzone, Q. L. Ying, E. Cattaneo and A. Smith (2005). "Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell." PLoS Biol **3**(9): e283.

Curtis, A. E., T. A. Smith, B. A. Ziganshin and J. A. Elefteriades (2016). "The Mystery of the Z-Score." Aorta (Stamford) **4**(4): 124-130.

Dinasarapu, A. R., D. J. Sutcliffe, F. Seifar, J. E. Visser and H. A. Jinnah (2022). "Abnormalities of neural stem cells in Lesch-Nyhan disease." J Neurogenet **36**(2-3): 81-87.

Ernst, M., A. J. Zametkin, J. A. Matochik, D. Pascualvaca, P. H. Jons, K. Hardy, J. G. Hankerson, D. J. Doudet and R. M. Cohen (1996). "Presynaptic dopaminergic deficits in Lesch-Nyhan disease." N Engl J Med **334**(24): 1568-1572.

Farr, S. A., S. Cuzzocrea, E. Esposito, M. Campolo, M. L. Niehoff, T. M. Doyle and D. Salvemini (2020). "Adenosine A(3) receptor as a novel therapeutic target to reduce secondary events and improve neurocognitive functions following traumatic brain injury." J Neuroinflammation **17**(1): 339.

Fishman, P. (2022). "Drugs Targeting the A3 Adenosine Receptor: Human Clinical Study Data." Molecules **27**(12).

Fishman, P., S. Bar-Yehuda, L. Madi and I. Cohn (2002). "A3 adenosine receptor as a target for cancer therapy." Anticancer Drugs **13**(5): 437-443.

Fumagalli, M., D. Lecca, M. P. Abbracchio and S. Ceruti (2017). "Pathophysiological Role of Purines and Pyrimidines in Neurodevelopment: Unveiling New Pharmacological Approaches to Congenital Brain Diseases." Front Pharmacol **8**: 941.

Gizer, I. R., C. Ficks and I. D. Waldman (2009). "Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review." Hum Genet **126**(1): 51-90.
Grace, A. A. (2016). "Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression." Nat Rev Neurosci **17**(8): 524-532.
Hamilton, P. J., N. G. Campbell, S. Sharma, K. Erreger, F. Herborg Hansen, C. Saunders, A. N. Belovich, N. A. A. S. Consortium, M. A. Sahai, E. H. Cook, U. Gether, H. S. McHaourab, H. J. Matthies, J. S. Sutcliffe and A. Galli (2013). "De novo mutation in the dopamine transporter gene associates dopamine dysfunction with autism spectrum disorder." Mol Psychiatry **18**(12): 1315-1323.
Hegarty, S. V., A. M. Sullivan and G. W. O'Keeffe (2013). "Midbrain dopaminergic neurons: a review of the molecular circuitry that regulates their development." Dev Biol **379**(2): 123-138.
Howes, O. D. and S. Kapur (2009). "The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III--the final common pathway." Schizophr Bull **35**(3): 549-562.
Hyman, S. E., R. C. Malenka and E. J. Nestler (2006). "Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory." Annu Rev Neurosci **29**: 565-598.
Janes, K., A. M. Symons-Liguori, K. A. Jacobson and D. Salvemini (2016). "Identification of A3 adenosine receptor agonists as novel non-narcotic analgesics." Br J Pharmacol **173**(8): 1253-1267.
Kee, N., N. Volakakis, A. Kirkeby, L. Dahl, H. Storvall, S. Nolbrant, L. Lahti, A. K. Bjorklund, L. Gillberg, E. Joodmardi, R. Sandberg, M. Parmar and T. Perlmann (2017). "Single-Cell Analysis Reveals a Close Relationship between Differentiating Dopamine and Subthalamic Nucleus Neuronal Lineages." Cell Stem Cell **20**(1): 29-40.
Kim, T. W., J. Piao, S. Y. Koo, S. Kriks, S. Y. Chung, D. Betel, N. D. Socci, S. J. Choi, S. Zabierowski, B. N. Dubose, E. J. Hill, E. V. Mosharov, S. Irion, M. J. Tomishima, V. Tabar and L. Studer (2021). "Biphasic Activation of WNT Signaling Facilitates the Derivation of Midbrain Dopamine Neurons from hESCs for Translational Use." Cell Stem Cell **28**(2): 343-355 e345.
Kirkeby, A., J. Nelander and M. Parmar (2012). "Generating regionalized neuronal cells from pluripotency, a step-by-step protocol." Front Cell Neurosci **6**: 64.
Kirkeby, A., S. Nolbrant, K. Tiklova, A. Heuer, N. Kee, T. Cardoso, D. R. Ottosson, M. J. Lelos, P. Rifes, S. B. Dunnett, S. Grealish, T. Perlmann and M. Parmar (2017). "Predictive Markers Guide Differentiation to Improve Graft Outcome in Clinical Translation of hESC-Based Therapy for Parkinson's Disease." Cell Stem Cell **20**(1): 135-148.
Liu, J. S., Y. Chen, D. D. Shi, B. R. Zhang and J. L. Pu (2022). "Pharmacogenomics-a New Frontier for Individualized Treatment of Parkinson's Disease." Curr Neuropharmacol.
Lloyd, K. G., O. Hornykiewicz, L. Davidson, K. Shannak, I. Farley, M. Goldstein, M. Shibuya, W. N. Kelley and I. H. Fox (1981). "Biochemical evidence of dysfunction of brain neurotransmitters in the Lesch-Nyhan syndrome." N Engl J Med **305**(19): 1106-1111.
Maia, T. V. and V. A. Conceicao (2018). "Dopaminergic Disturbances in Tourette Syndrome: An Integrative Account." Biol Psychiatry **84**(5): 332-344.
Melani, A., A. M. Pugliese and F. Pedata (2014). "Adenosine receptors in cerebral ischemia." Int Rev Neurobiol **119**: 309-348.
Mesman, S. and M. P. Smidt (2020). "Acquisition of the Midbrain Dopaminergic Neuronal Identity." Int J Mol Sci **21**(13).
Nishiga, M., L. S. Qi and J. C. Wu (2021). "CRISPRi/a Screening with Human iPSCs." Methods Mol Biol **2320**: 261-281.
Pardinas, A. F., M. J. Owen and J. T. R. Walters (2021). "Pharmacogenomics: A road ahead for precision medicine in psychiatry." Neuron **109**(24): 3914-3929.
Parmar, M., S. Grealish and C. Henchcliffe (2020). "The future of stem cell therapies for Parkinson disease." Nat Rev Neurosci **21**(2): 103-115.
Paval, D. (2017). "A Dopamine Hypothesis of Autism Spectrum Disorder." Dev Neurosci **39**(5): 355-360.
Robbins, T. W. (2003). "Dopamine and cognition." Curr Opin Neurol **16 Suppl 2**: S1-2.
Ruillier, V., J. Tournois, C. Boissart, M. Lasbareilles, G. Mahe, L. Chatrousse, M. Cailleret, M. Peschanski and A. Benchoua (2020). "Rescuing compounds for Lesch-Nyhan disease identified using stem cell-based phenotypic screening." JCI Insight **5**(4).
Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." Cell **131**(5): 861-872.
Torres, R. J. and J. G. Puig (2015). "Hypoxanthine deregulates genes involved in early neuronal development. Implications in Lesch-Nyhan disease pathogenesis." J Inherit Metab Dis **38**(6): 1109-1118.
Witteveen, J. S., S. R. Loopstok, L. L. Ballesteros, A. Boonstra, N. H. M. van Bakel, W. H. P. van Boekel, G. J. M. Martens, J. E. Visser and S. M. Kolk (2022). "HGprt deficiency disrupts dopaminergic circuit development in a genetic mouse model of Lesch-Nyhan disease." Cell Mol Life Sci **79**(6): 341.

Conflict of Interest
The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Author Contributions
ML, CB, JT, LC and TP design and performed the experiment and analyzed the data. ML and CB contributed to the manuscript redaction. AB conceived and designed the study, analyzed the data and write the manuscript.

Funding
ML received a PhD grant from The French Ministry of Science and Technology. This work received a grant from the French Agency of Biomedicine (ABM AOR greffe 2017). I-Stem is part of the Biotherapies Institute for Rare Diseases (BIRD) and is financially supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon).

Acknowledgments
The authors want to thanks ISTEM administrative staff for their constant support with the logistic and financial aspects of this study. The authors are Genopole's members, first french biocluster dedicaced to genetic, biotechnologies and biotherapies, this work involved experiment performed using material and competency of the OCCIGEN platform. This study used samples from the NINDS Human Genetics Resource Center DNA and Cell Line Repository, as well as clinical data. NINDS Repository sample numbers corresponding this study is GM04603.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Differentiation of pluripotent stem cells into midbrain progenitors competent to produce dopaminergic neurons in a high throughput screening format
A- Schematic representation of the differentiation protocol. DIV: day in vitro, PSC: pluripotent stem cells, NEP: neuroepithelial cells, DA: dopamine.
B- Representative image of SOX2, EN-1 and FOXA2 labelling in day 25 progenitors. Scale bars=50µm
C- Quantification of the proportion of cells expressing the markers SOX2, EN-1 and FOXA2 in day 25 progenitor cultures. Percentage of cell is calculated considering Hoechst positive nuclei as the reference population. Box-and-whisker plots: Boxes extends from the 25th to 75th percentiles. Whiskers range from the min to max values. Bar represents the median. N=12 well/per condition. Each well represent independent differentiations.
D- Representative image of HuC/D, TH and AADC labelling in neurons obtained after 28 days terminal differentiation of day 25 progenitors. Scale bars=25µm
E- Quantification of the proportion of cells expressing the markers HuC/D, TH and AADC in neuronal cultures. Percentage of cell is calculated considering Hoechst positive nuclei as the reference population. Box-and-whisker plots: Boxes extends from the 25th to 75th percentiles. Whiskers range from the min to max values. Bar represents the median. N=8 well/per condition. Each well represent independent neuronal differentiations.

Figure 2: Primary screening of the purine and adenosine compound library. A- Dot plot representation of screening results at 5 and 20µM. Each dot represent the mean of the 4 wells treated with a given compound. Green horizontal bar represents the mean of all compound tested (z-score =0). The blue horizontal bar (z-score = 1) represent the limit above which a compound was considered as a potential candidate. The vertical dashed line represent 70% of cell survival compared to vehicle-treated cells.
B- Representative images of EN-1 and FOXA2 labelling in day 25 progenitors after treatment with the selected compounds. Scale bars=50µm
C- Quantification of the proportion of cells expressing the markers EN-1 and FOXA2 in day 25 progenitor cultures after treatment with the selected compounds. Percentage of cell is calculated considering Hoechst positive nuclei as the reference population. Box-and-whisker plots: Boxes extends from the 25th to 75th percentiles. Whiskers range from the min to max values. Bar represents the median. N=4 well/per condition.
D- List of the selected compound with their known reported activity.

Figure 3: Evaluation of the robustness and repeatability of the selected compound activity
A- Dose dependent activity of the compounds selected after the primary screening.
B- Representative images of EN-1 and FOXA2 labelling in day 25 progenitors after treatment with the C08 compounds. Scale bars=50µm.
C- Representative images of ADORA3 labelling in day 16 progenitors. Scale bars = 25 µm.

Figure 4: Evaluation of C08 activity in a Lesch-Nyhan disease model
A- Western-blot analysis of HGPRT expression in SA001 derived clones. Actin was used as a loading control.
B- Quantification of the percentage of HuC/D positive neurons produced by WT and HGPRT -/Y cells from day 25 progenitors with or without C08 treatment.
C- Quantification of the proportion of cells expressing the markers EN-1 and FOXA2 in day 25 progenitor cultures after treatment with the C08 compound. Box-and-whisker plots: Boxes extends from the 25th to 75th percentiles. Whiskers range from the min to max values. Bar represents the median. N = 8 wells/per condition. Each well represent an independent differentiation.
D- Representative images of EN-1 and FOXA2 labelling in day 25 progenitors after treatment with the C08 compounds. Scale bars = 25µm.
E- Quantification of the proportion of neurons expressing the markers TH and AADC after 28 days of differentiation in neuronal medium of in 25 progenitor cultures treated with the C08 compound. Box-and-whisker plots: Boxes extends from the 25th to 75th percentiles. Whiskers range from the min to max values. Bar represents the median. N= 6 wells/per condition. Each well represent an independent differentiation.
D- Representative images of TH and AADC labelling after treatment with the C08 compounds. Scale bars=25µm.

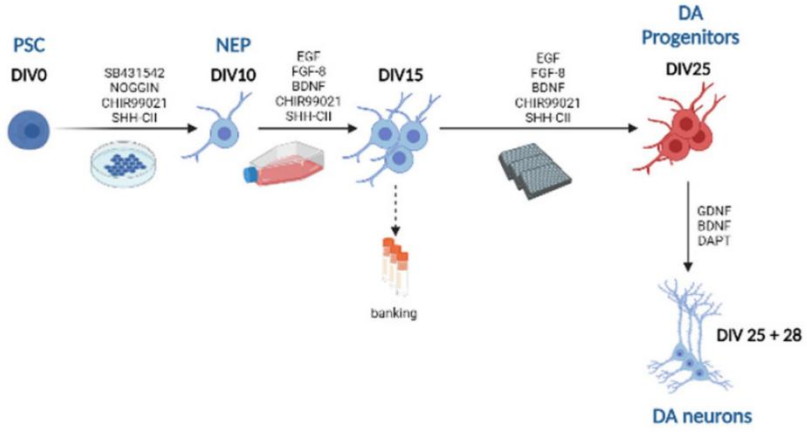
Figure S1: Seeding quality following automated cell dispensing
A- Representative whole-well image of cell dispersion of day 25 progenitors seeded at day 15 using automated liquid handling devices. Scale bar = 200µm.
B- Quantification of cell number per well. Each dot represents one well. N=12 wells per cell line.

Table S1: Pluripotent stem cells lines used in this study.
Table S2: List and description of the compounds tested during the primary screening.

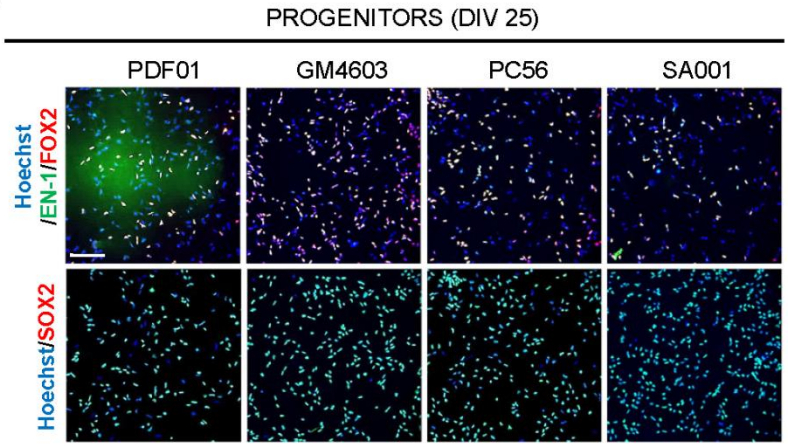
Table S3: List of the primary antibodies used in this study.

Lasbareilles et al.
Figure 1

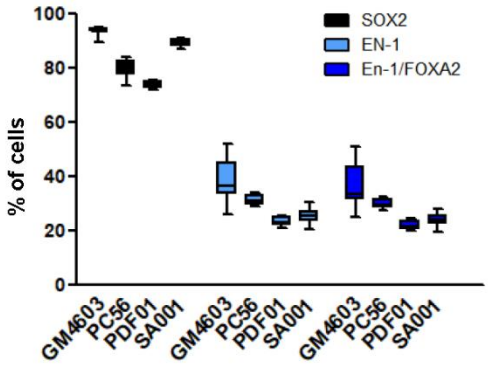
A



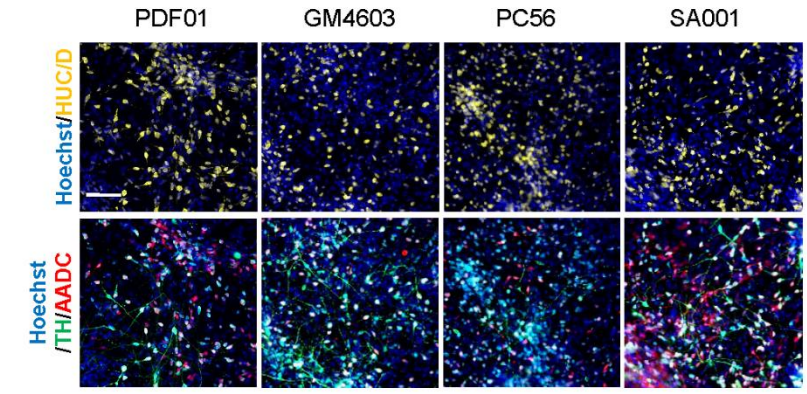
B



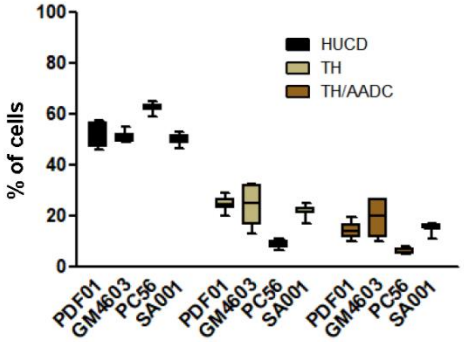
C



D

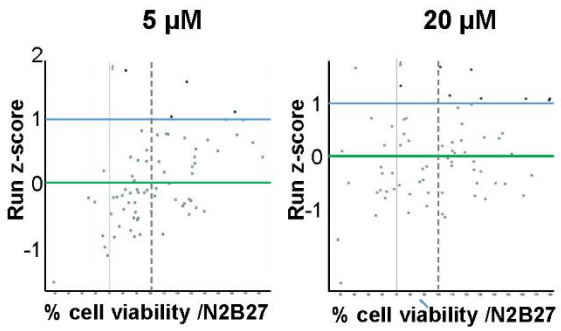


E

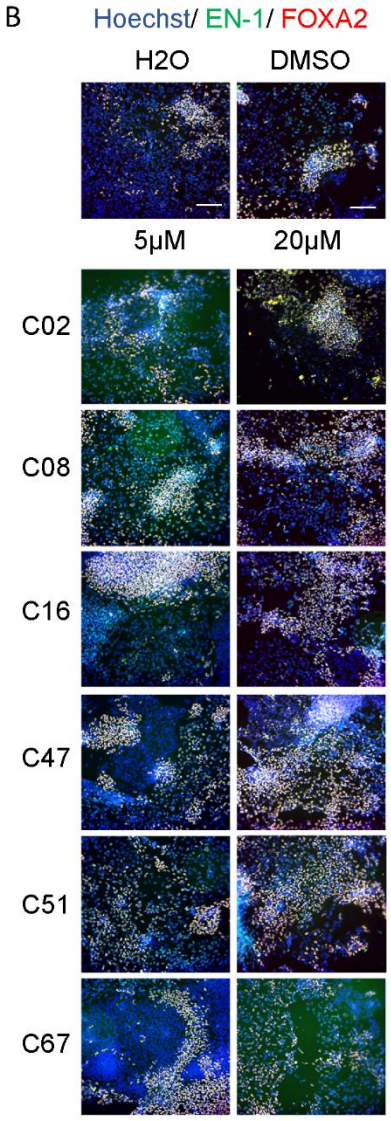


Lasbareilles et al.
Figure 2

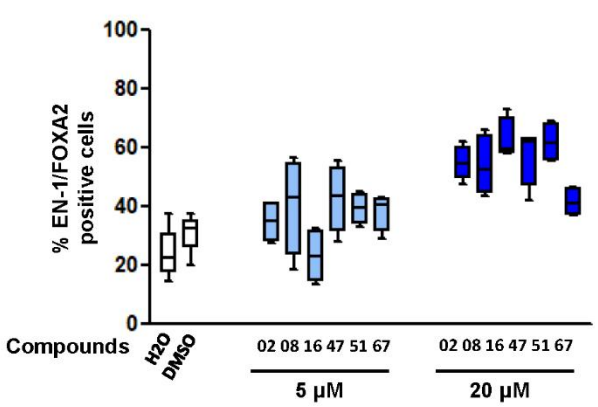
A



B



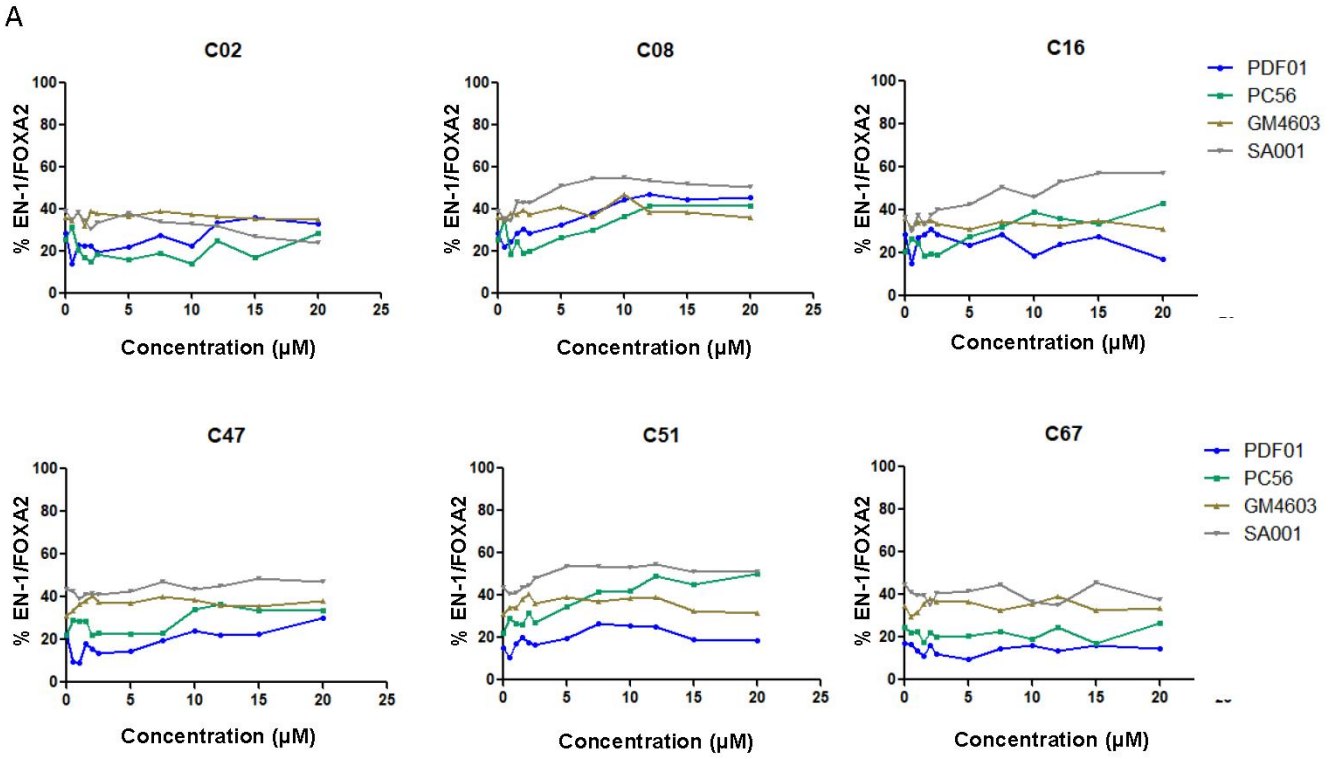
C

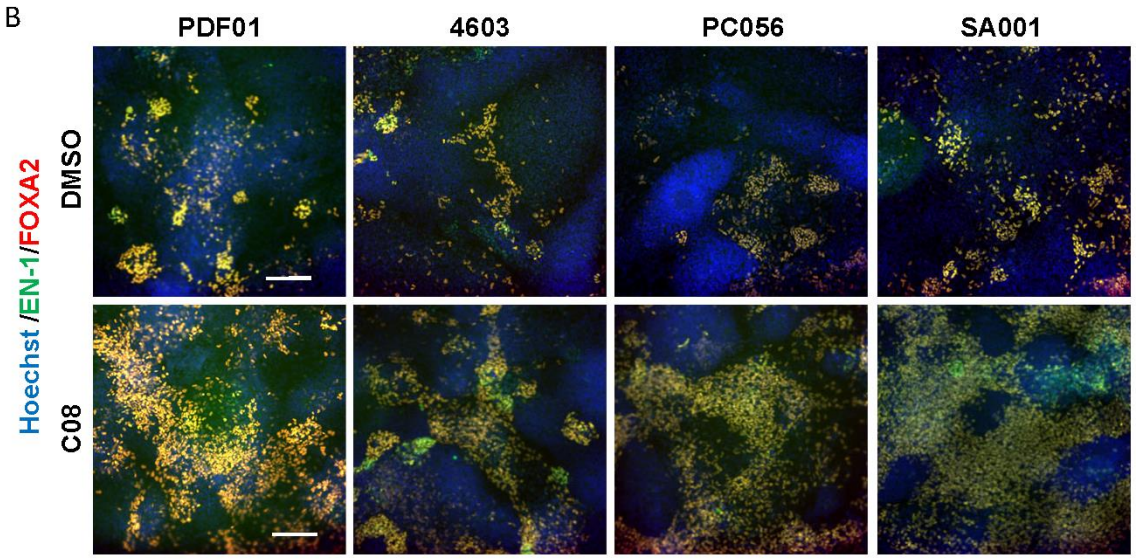


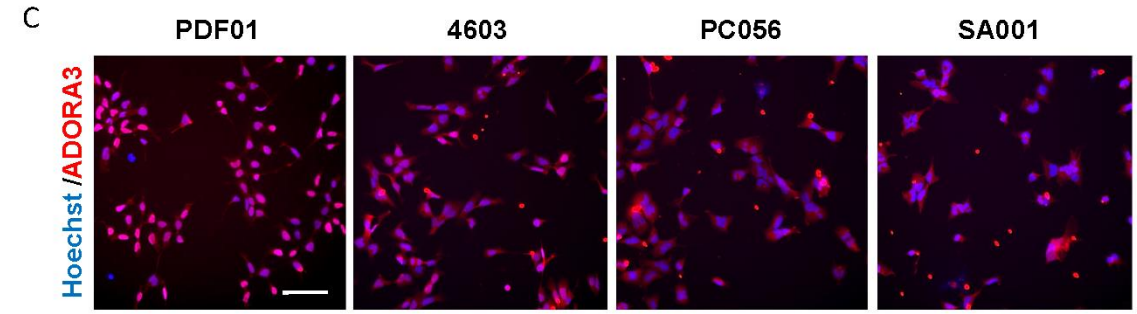
D

cpd #	CAS #	compound name	annoted activity
2	96760-69-9	Adenosine amine congener	A1 adenosine agonist
8	152918-18-8	1-Deoxy-1-[6-[[(3-iodophenyl)methyl]amino] -9H-purin-9-yl]-N-methyl-β-D-ribofuranuronamide	A3 adenosine agonist
16	102146-07-6	8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine	A1 adenosine antagonist
47	15763-06-1	1-Methyladenosine	Adenosine analog
51	6736-58-9	3-Deazaadenosine	Adenosine analog
67	19817-92-6	Uridine-5'-triphosphate·3Na	P2Y4 agonist

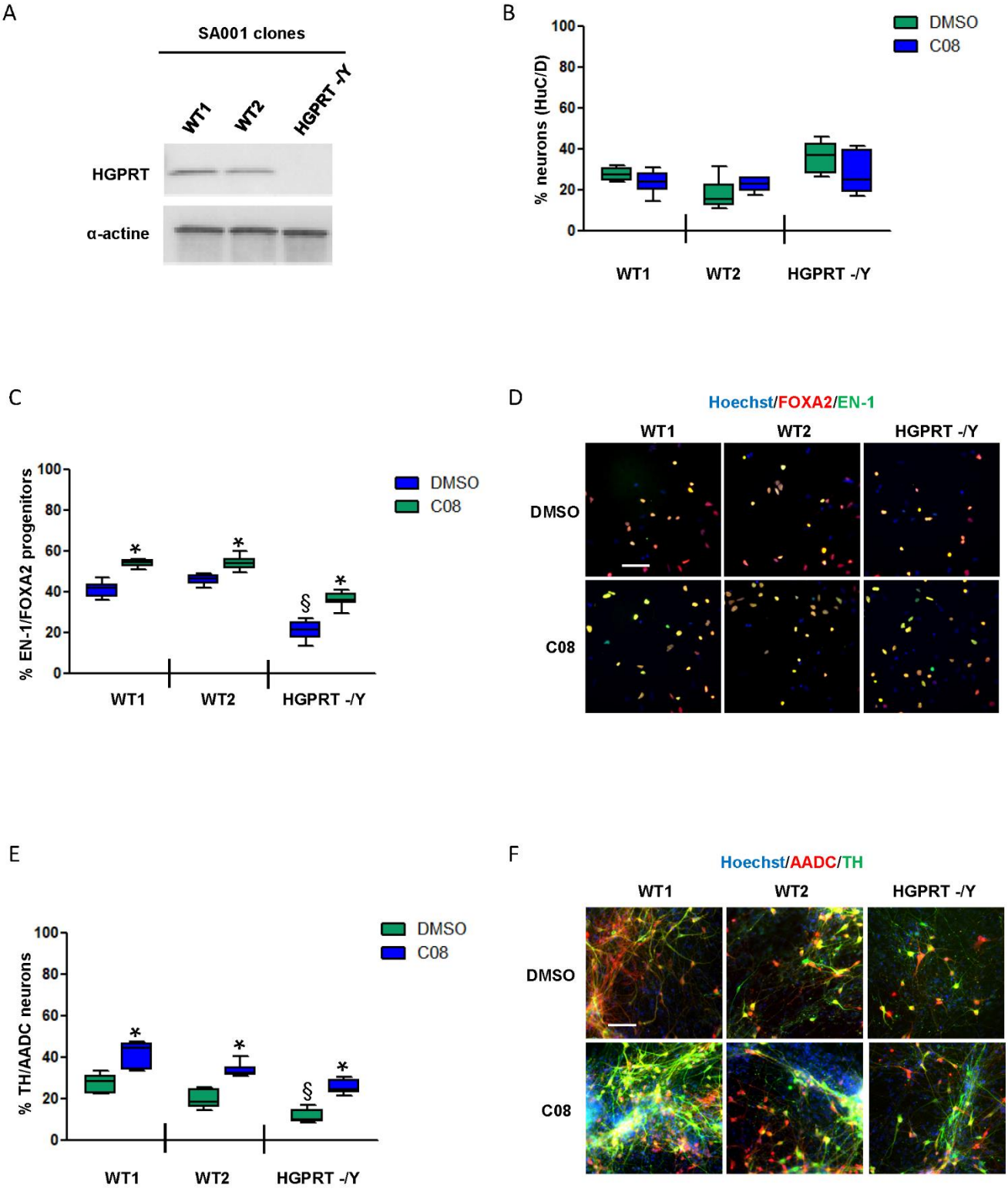
Lasbareilles et al.
Figure 3



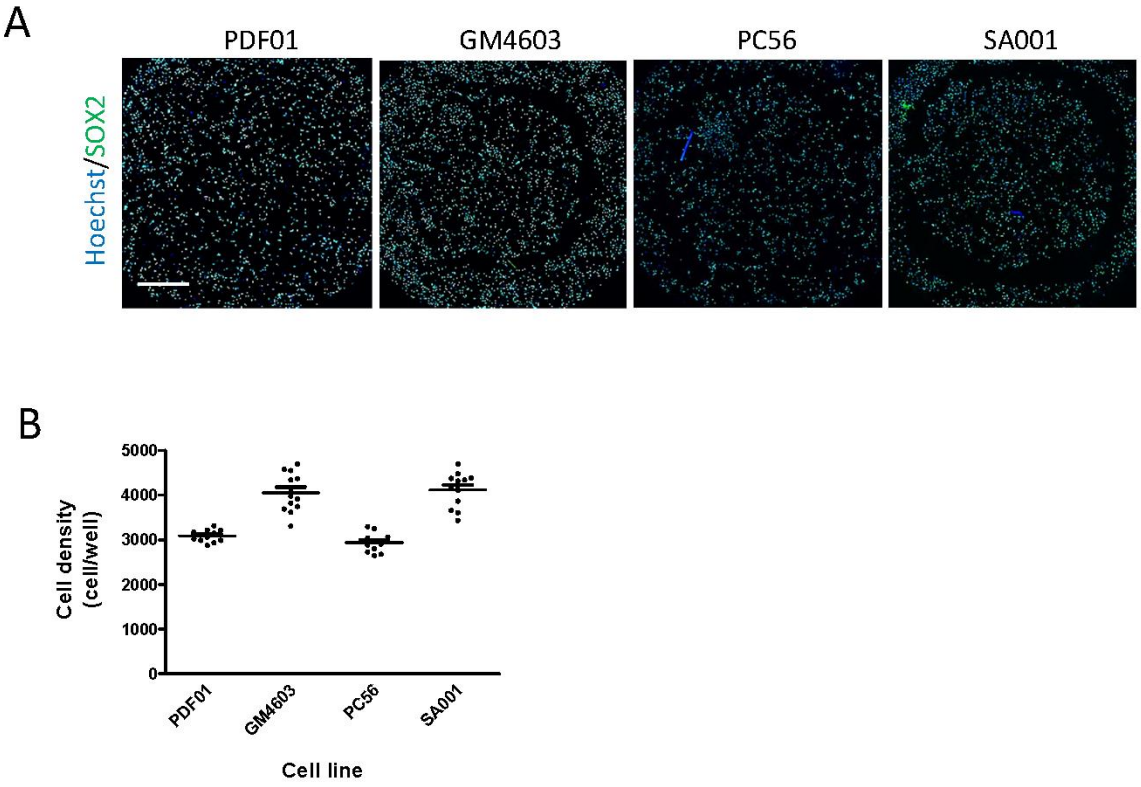




Lasbareilles et al.
Figure 4



Lasbareilles et al.
Figure S1



Lasbareilles et al Table S1

Cell type	Donnor code	Cell of origin	Provider	Karyotype
hiPSC	PC56	fibroblasts	Phenocell, France	46, XX
hiPSC	GM04603	fibroblasts	Coriell, USA	46, XY
hiPSC	PDF01	fibroblasts	EFS, France	46, XX
hESC	SA001	IVF embryo	Cellartis, sweden	46, XY

Lasbareilles et al Table S2

N° composé	Cat. No.	CAS #	Drug Name	M.W.	Solvent	Activity
1	AC-589	58-61-7	Adenosine	267,2	DMSO	Endogenous agonist
2	AC-590	96760-69-9	Adenosine amine congener	576,6	DMSO	A1 adenosine agonist
3	AC-594	146-77-0	2-Chloroadenosine	301,7	WATER	A1 adenosine agonist
4	AC-601	78647-50-4	5'-N-Ethylcarboxamidoadenosine	308,3	DMSO	A1/A2 adenosine agonist
5	AC-961	50908-62-8	5'-(N-Cyclopropyl)carboximidoadenosine	320,3	DMSO	A2 adenosine agonist
6	AC-776	35788-27-3	5'-N-Methylcarboxamidoadenosine		DMSO	A2 adenosine agonist
7	AC-581	163042-96-4	1-[2-Chloro-6-[[(3-iodophenyl)methyl]amino]-9H-purin-9-yl]-1-deoxy-N-methyl-β-D-ribofuranuronamide	544,7	DMSO	A3 adenosine agonist
8	AC-582	152918-18-8	1-Deoxy-1-[6-[[(3-iodophenyl)methyl]amino]-9H-purin-9-yl]-N-methyl-β-D-ribofuranuronamide	510,3	DMSO	A3 adenosine agonist
9	AC-588	152918-26-8	N6-(4-Aminobenzyl)-N-methylcarboxamidoadenosine	399,4	DMSO	A3 adenosine agonist
10	AC-1308	89705-21-5	N6-2-(4-Aminophenyl)ethyladenosine	386,4	DMSO	
11	AC-585	183721-15-5	MRS 1220	403,8	DMSO	A3 adenosine antagonist
12	AC-586	139180-30-6	ZM 241385	337,3	DMSO	A2A adenosine antagonist
13	AC-772	35873-49-5	8-Cyclopentyltheophylline	248,3	DMSO	A1 adenosine antagonist
14	AC-773	36396-99-3	N6-Cyclohexyladenosine	349,4	DMSO	A1 adenosine agonist
15	AC-774	41552-82-3	N6-Cyclopentyladenosine	335,4	DMSO	A1 adenosine agonist
16	AC-775	102146-07-6	8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine	304,4	DMSO	A1 adenosine antagonist
17	AC-778	58-55-9	Theophylline	180,2	DMSO	A2B adenosine receptor ligand
18	AC-627	519-37-9	7-(β-Hydroxyethyl)theophylline	224,2	DMSO	Theophylline analog
19	AC-636	80206-91-3	8-(p-Sulfophenyl)theophylline	336,3	DMSO	Adenosine antagonist
20	AC-615	317-34-0	Aminophylline	420,4	DMSO	Theophylline analog
21	AC-626	80288-49-9	Furafylline	260,2	DMSO	Methylxanthine derivative
22	AC-648	55242-55-2	Propentofylline	306,4	DMSO	Adenosine transport inhibitor
23	LP-102	6493-06--7	(±)-Lisofylline	280,3	DMSO	
24	AC-595	37739-05-2	2-Chloro-N6-cyclopentyladenosine	369,8	DMSO	A1 adenosine agonist
25	ALX-550-322	58-08-2	Caffeine	194,2	DMSO	A1/A2A adenosine antagonist
26	AC-609	38594-96-6	(-)-N6-(2-Phenylisopropyl)adenosine	385,4	DMSO	A1 adenosine agonist
27	AC-610	38594-97-7	(+)-N6-(2-Phenylisopropyl)adenosine	385,4	DMSO	A1 adenosine agonist Less active isomer
28	AC-611	143668-15-9	N6-P-Sulfophenyladenosine sodium salt	445,4	DMSO	A1 adenosine agonist
29	AC-612	490-59-5	Alloxazine	214,2	DMSO	A2B adenosine antagonist
30	AC-633	611-59-6	Paraxanthine	180,2	DMSO	Adenosine receptor ligand
31	AC-613	149981-23-7	1-Allyl-3,7-dimethyl-8-phenylxanthine	296,3	DMSO	A1 adenosine antagonist
32	AC-614	149981-25-9	1-Allyl-3,7-dimethyl-8-p-sulfophenylxanthine	376,4	DMSO	A2 adenosine antagonist
33	AC-623	31542-63-9	1,3-Dipropyl-7-methylxanthine	250,3	DMSO	A2 adenosine receptor ligand
34	AC-625	14114-46-6	3,7-Dimethyl-1-propargylxanthine	218,2	DMSO	A2 adenosine antagonist
35	AC-628	28822-58-4	3-Isobutyl-1-methylxanthine	222,2	DMSO	Adenosine receptor antagonist
36	AC-951	85872-53-3	1,3-Dipropyl-8-phenylxanthine	312,4	DMSO	A1 adenosine antagonist
37	AC-635	41078-02-8	3-n-Propylxanthine	194,2	DMSO	A1/2 adenosine antagonist
38	AC-617	104615-18-1	(9-Chloro-2-(2-furyl)(1,2,4)triazolo(1,5-C)quinazolin-5-amine)	285,7	DMSO	Adenosine receptor antagonist
39	AC-619	147700-11-6	8-(3-Chlorostyryl)caffeine	330,8	DMSO	A2A adenosine antagonist
			Blank			
40	AC-640	20153-98-4	Dilazep·HCl	677,6	DMSO	Adenosine uptake inhibitor
41	PD-129	51350-19-7	(±)-Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine·HCl	313,8	DMSO	Adenosine deaminase inhibitor
42	EI-293	24386-93-4	5-Iodotubericidin	392,1	DMSO	Adenosine kinase inhibitor
43	AD-101	38048-32-7	S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosine	419,4	DMSO	Adenosine uptake inhibitor
44	AC-646	13153-27-0	S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioguanosine	434,4	DMSO	Adenosine transport inhibitor
45	AD-100	102146-07-6	PD 116,948	304,4	DMSO	A1 adenosine antagonist
46	EI-127	58-32-2	Dipydridamole	504,6	DMSO	Adenosine transport inhibitor
47	AC-988	15763-06-1	1-Methyladenosine	281,3	DMSO	Adenosine analog
48	AC-989	1867-73-8	N6-Methyladenosine	281,3	DMSO	Adenosine analog
49	AC-990	2002-35-9	N6-Methyl-2'-deoxyadenosine	265,3	DMSO	Adenosine analog
50	AC-991	979-92-0	S-Adenosyl-L-homocysteine	384,4	DMSO	Adenosine conjugate
51	AC-992	6736-58-9	3-Deazaadenosine	266,3	DMSO	Adenosine analog

	Cat. No.	CAS #	Drug Name	M.W.	Solvent	Activity
52	AC-953	51963-61-2	ATP disodium salt	551,1	WATER	Endogenous P2Y agonist
53	AC-944	43170-89-4	2-Methylthioadenosine triphosphate	641,2	WATER	P2Y agonist
54	AC-1290	135046-48-9	Clopidogrel sulfate	419,9	DMSO	P2Y12 inhibitor
55	AC-946	104869-31-0	NF 023	1162,9	WATER	P2X antagonist
56	AC-947	202983-32-2	NF 279	1401,1	DMSO	P2X1 antagonist
57	AC-948	149017-66-3	Pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid·4Na	599,3	WATER	P2X antagonist
58	AC-950	1021868-77-8	Pyridoxal-5'-phosphate-6-(2'-naphthylazo-6'-nitro-4',8'-disulfonate)·4Na (PPNDS)	693,9	DMSO	P2X1 antagonist
59	AC-954	102783-36-8	P1,P4-Di(adenosine-5')tetraphosphate ammonium salt	836,4	DMSO	Purinergic receptor ligand
60	AC-955	104809-20-3	α,β-Methyleneadenosine 5'-triphosphate	505,2	WATER	P2X agonist
61	AC-956	7414-56-4	β,γ-Methyleneadenosine 5'-triphosphate·2Na	549,2	WATER	P2X agonist
62	G-430	129-46-4	Suramin·6Na	1429,2	DMSO	P2Y antagonist
63	AC-1002	149022-20-8	Adenosine-5'-monophosphate (AMP)	347,2	DMSO	ATP metabolite
64	AC-995	81921-35-9	N6-Methyladenosine-5'-monophosphate·Na	383,2	WATER	AMP analog
65	AC-996	68414-18-6	Adenosine-5'-diphosphoribose	559,3	DMSO	Endogenous P2Y agonist
66	AC-997	20398-34-9	Adenosine-5'-diphosphate (ADP)	427,2	WATER	Endogenous P2Y agonist
67	AC-998	19817-92-6	Uridine-5'-triphosphate·3Na	550,1	WATER	P2Y4 agonist
68	AC-999	21931-53-3	Uridine-5'-diphosphate	404,2	WATER	P2Y6 agonist
69	AC-1000	3387-36-8	Uridine-5'-monophosphate	368,1	WATER	UTP metabolite
70	AC-1001	104835-70-3	α,β-Methyleneadenosine-5'-diphosphate·Na	425,2	DMSO	ADP agonist
71	AC-993	53885-35-1	Ticlopidine·HCl	300,2	DMSO	P2Y12 receptor ligand
72	AC-1003	36051-31-7	Guanosine-5'-triphosphate·Na	523,2	WATER	Endogenous agonist
73	AC-1004	43139-22-6	Guanosine-5'-diphosphate	443,2	WATER	Endogenous agonist

Lasbareilles et al. Table S3 : Antibodies

Target	Host	Reference	Provider	Dilution
SOX2	Rabbit	AB5603	EMD Millipore Corp., Merck, Germany	1 :500
Engrail-1 (EN-1)	Mouse	4G11	DSHB, USA	1 :100
FOXA2	Goat	AF2400	R&D Systems®, USA	1 :500
Tyrosine Hydroxylase	Rabbit	ab112	abcam, UK	1 :500
AADC	Goat	AF3564	R&D Systems®, USA	1 :100
HuC/D neuronal protein	Mouse	A21271	Invitrogen™ Thermo Scientific, USA	1 :250
ADORA3	Rabbit	PA5-102048	Invitrogen™ Thermo Scientific, USA	1 :250
HGPRT	Rabbit	15059-1-AP	Proteintech, USA	1 :1000
Beta- Actin	Mouse	A3854	Sigma-Aldrich, USA	1 :50000

Table S3: List of the primary antibodies used in this study.

3. Travaux de développement et d'optimisation autour du protocole

Pour rappel, lors de la différenciation terminale en neurones, il est nécessaire d'ensemencer les progéniteurs à J25 dans des microplaques 384. La phase de spécification des progéniteurs de J15 à J25 se fait alors dans des flasques de culture, le passage des cellules de microplaque en microplaque n'ayant pas été envisagé dans cette étude. (Protocole de la Figure 44A de la partie Résultats 1).

Au bout des 28 jours de différenciation terminale, nous obtenons les neurones dopaminergiques exprimant la TH et l'AADC ainsi que HuCD. Cependant après plusieurs différenciations j'ai pu rencontrer plusieurs difficultés. La première étant la prolifération des cellules (Figure 54A). A plusieurs reprises, les tapis cellulaires se sont décollés des puits des microplaques avant la fin des 28 jours de différenciation. Les neurones étant des cellules fragiles, une trop grande densité entraine la formation de trous dans le tapis et le décollement des cellules *in fine,* spontanément ou lors des changements de milieu. De plus pour les neurones atteignant les 28 jours, on peut observer en plus d'un tapis dense pouvant rendre les marquages et les analyses difficiles (bruit de fond important), des neurones plutôt immatures avec des petits corps cellulaires (Figure 54B). Lorsque la densité cellulaire est trop importante, l'analyse des marquages acquis est moins précise et une partie des neurones et des cellules présentes dans les puits risque de ne pas être détectée par les imageurs en particulier dans les clusters de neurones (Figure 54B).

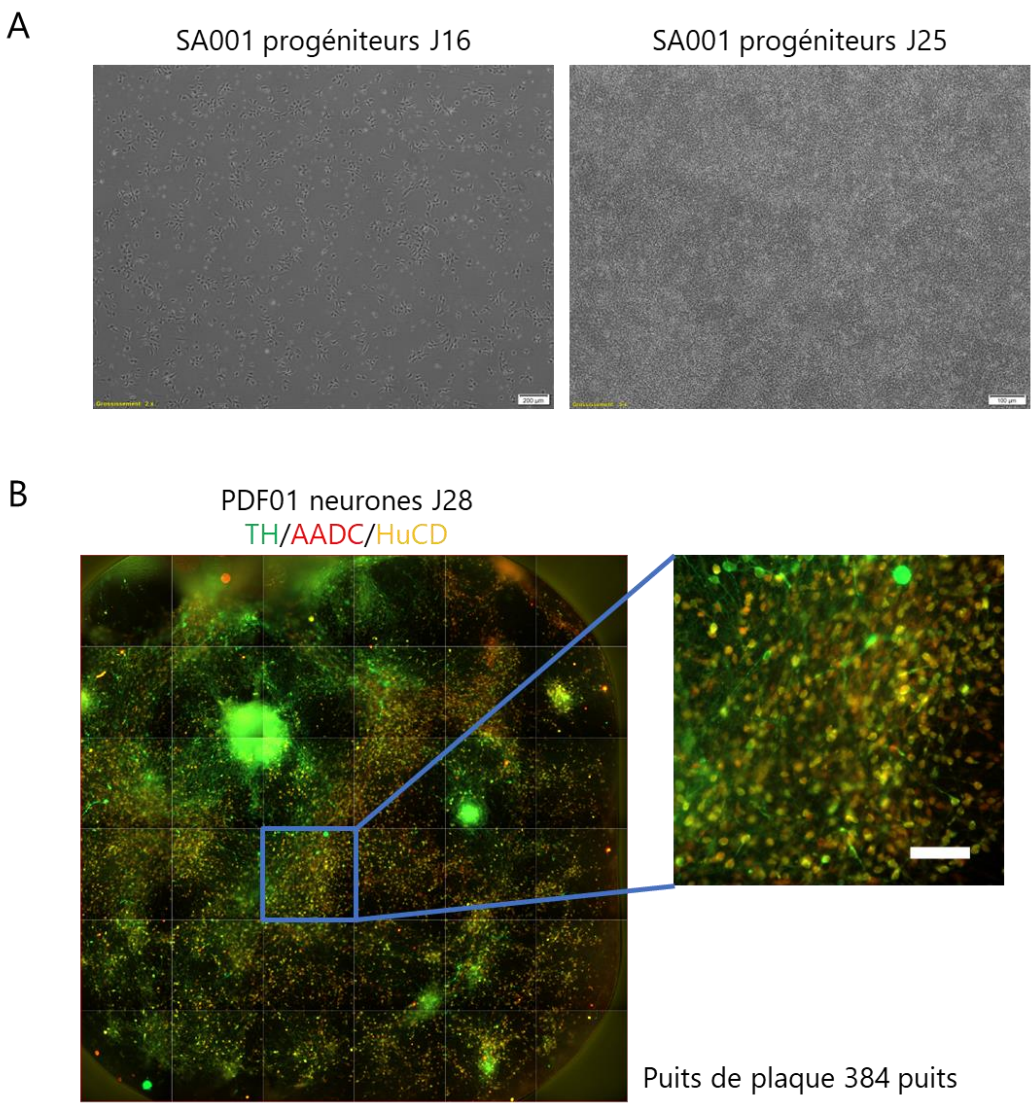


Figure 54 : Observations faites lors de la différenciation terminale des progéniteurs.

(A) Exemple des progéniteurs en T25 SA001, les progéniteurs ensemencés à 20 000 cellules par cm² le J16 prolifèrent jusqu'à former un tapis cellulaire très dense le J25. Barre d'échelle : 200µm à J16 et 100µm à J25. (B) Exemple d'un puits de P384 avec des neurones PDF01 à J28. Le tapis cellulaire est assez dense. Certains groupes de neurones sont « flous » ou le marquage est trop fort. On observe un début de décollement en haut du puits. Barre d'échelle : 50µm.

L'hypothèse est que l'état très prolifératif des progéniteurs conduit à une entrée retardée en différenciation, les cellules continueraient donc de proliférer avant de commencer leur différenciation en neurones et leur maturation. Afin de limiter cet état prolifératif et d'améliorer l'entrée en différenciation des progéniteurs, j'ai envisagé deux options :

- La première : essayer de contrôler la prolifération des progéniteurs neuroépithéliaux pendant la phase d'expansion en flasque sans la bloquer, ce qui risquerait de conduire à une quantité insuffisante de cellules ou une entrée en différenciation avant le J25.
- La seconde : tenter d'améliorer l'entrée en différenciation des progéniteurs au début de la phase de différenciation en microplaque.

Cette étape de développement a été réalisé en condition N2B27 avec le protocole de base, sans traitement avec les composés du criblage.

3.1. Contrôle de la prolifération des progéniteurs en phase d'expansion

Différents paramètres peuvent jouer sur la prolifération cellulaire : les cytokines utilisées dans le milieu de croissance, la composition du milieu lui-même, le temps de culture ou encore la densité de cellules choisie aux étapes clés (induction, ensemencement dans un nouveau support, différenciation etc.). Pour limiter la prolifération des progéniteurs entre les jours 15 et 25 en flasque de culture, j'ai dans un premier temps testé différentes densités d'ensemencement. Le but étant de déterminer une concentration cellulaire de départ avant traitement sans arriver à confluence avant les 10 jours de prolifération. Quatre densités d'ensemencement ont été testées pour les progéniteurs induits à partir de la lignée PDF01 et la lignée SA001 : 15 000, 17 000, 25 000 et 35 000 cellules par cm^2 (la densité utilisée pour le passage en microplaque le J15 pour les DR était de 20 000 cellules par cm^2). J'ai choisi deux densités plus faibles pour regarder si cela ralentissait la prolifération, et au contraire deux plus fortes pour voir si un sur-ensemencement entrainerait la sur-prolifération (Figure 55A).

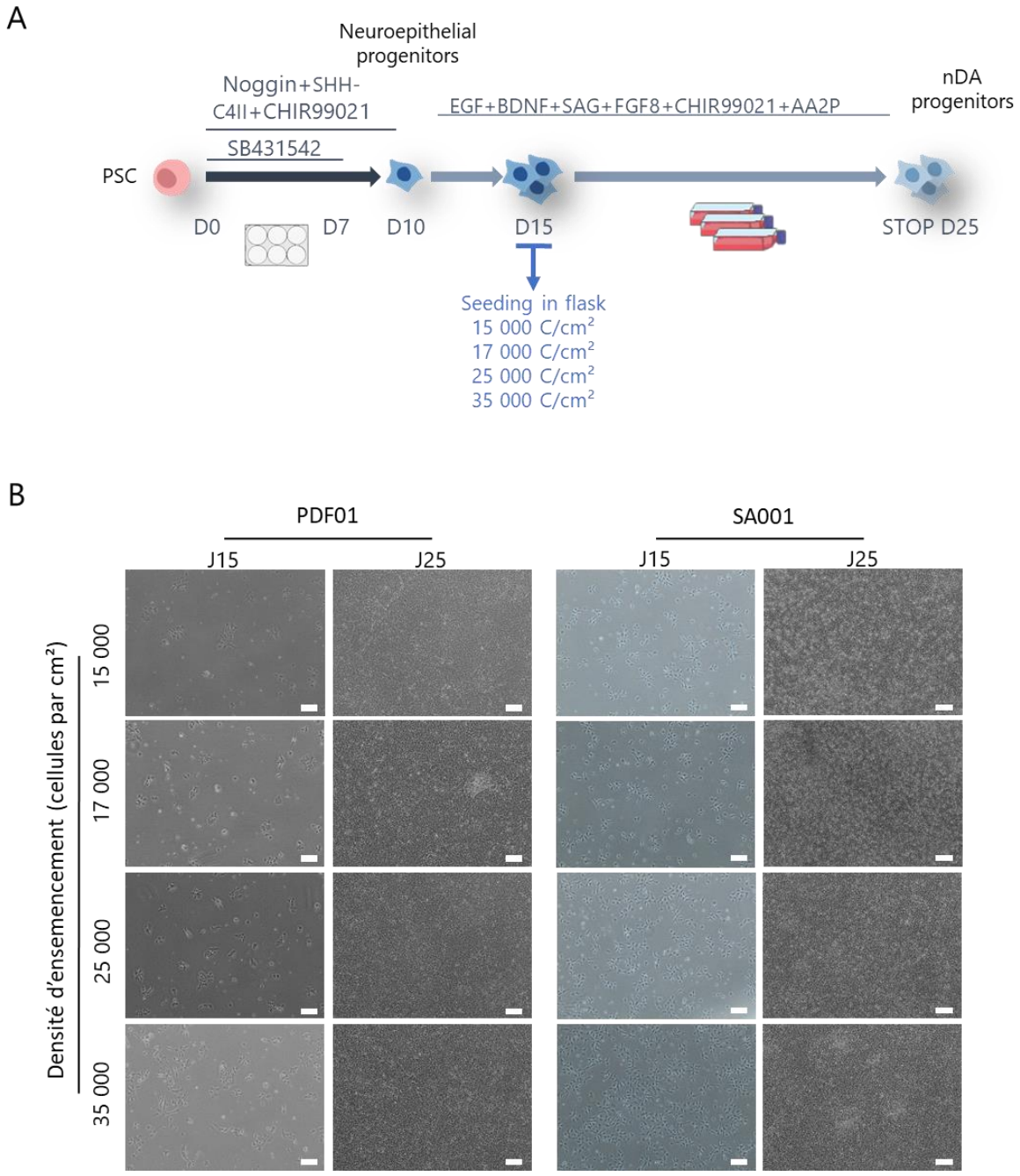


Figure 55 : Test des densités cellulaires d'ensemencement en T25 à J15.

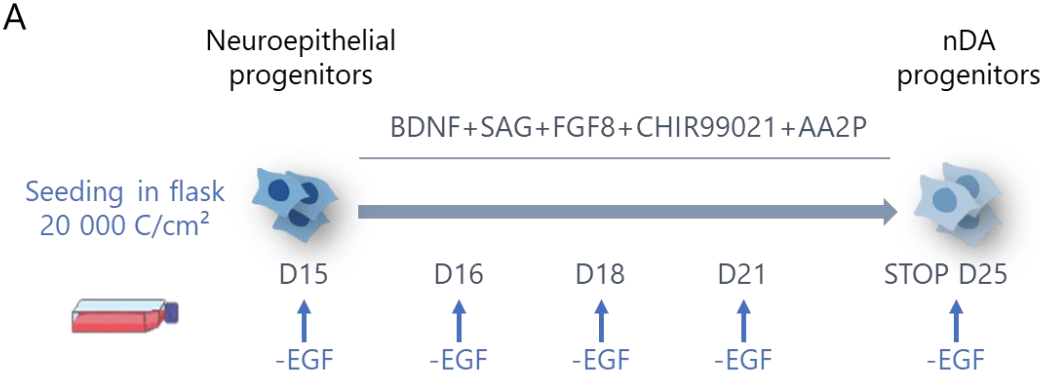
Test d'ensemencement des progéniteurs J15 à différentes densités pour les progéniteurs induits à partir des lignées SA001 et PDF01. (A) Schéma du protocole. (B) La confluence des cellules a été suivie pendant dix jours jusqu'à J25, jour de fixation des progéniteurs. Barre d'échelle = 100µm.

Pour ces deux lignées, l'état de confluence a été atteint avant les dix jours de prolifération dans chacune des flasques. Au J25 de l'induction, le tapis cellulaire était très dense (Figure 55B). J'ai donc choisi de conserver la densité cellulaire de base (20 000 cellules par cm^2) pour garder

les mêmes conditions.

La deuxième option concernant la partie progéniteurs a été de retirer une cytokine favorisant la croissance cellulaire pendant la période d'amplification : l'EGF. J'ai testé plusieurs temps de retrait de l'EGF : J15 (dès l'ensemencement en flasque), à chaque changement de milieu correspondant également aux temps de traitement (J16, J18 et J21) et J25 (jour de la fixation et condition contrôle avec conservation de l'EGF) (Figure 56A). Pour chaque temps un suivi de la confluence a été effectué au microscope jusqu'à J25. Les tapis cellulaires étaient très denses pour les deux lignées pour chacune des conditions à J25 (Figure 56B).

A


Neuroepithelial progenitors
nDA progenitors
BDNF+SAG+FGF8+CHIR99021+AA2P
Seeding in flask
20 000 C/cm²
D15
D16
D18
D21
STOP D25
-EGF
-EGF
-EGF
-EGF
-EGF

B

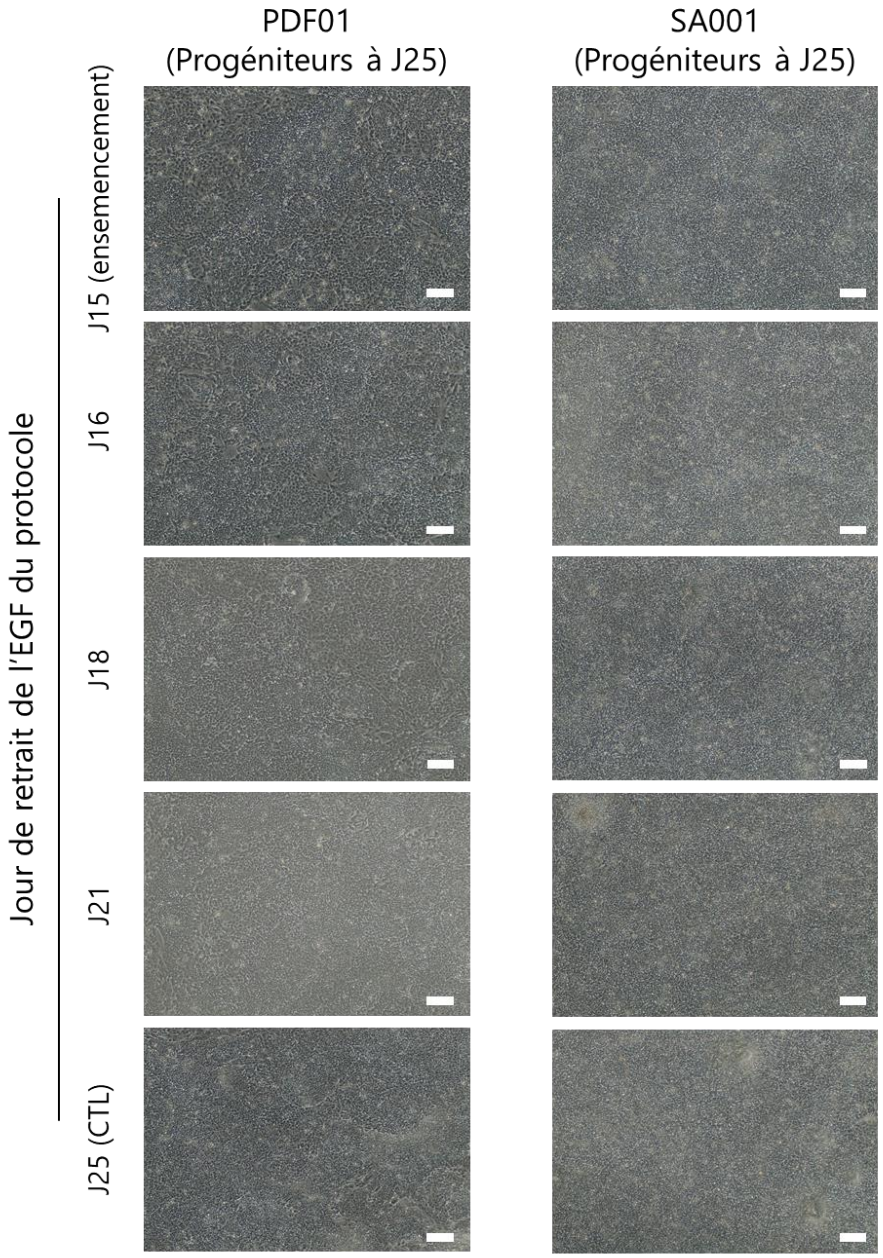

PDF01
(Progéniteurs à J25)
SA001
(Progéniteurs à J25)
Jour de retrait de l'EGF du protocole
J15 (ensemencement)
J16
J18
J21
J25 (CTL)

Figure 56 : Test de retrait de l'EGF du mix de cytokines (retrait entre J15 et J25).

(A) Schéma du protocole de traitement. (B) Image des progéniteurs à J25 de l'induction après amplification en flasque avec retrait de l'EGF à différents temps. L'EGF a été retiré du milieu dès l'ensemencement (J15), lors de chaque changement de milieu (J16, J18 et J21) ou laissé jusqu'à J25 (condition contrôle). Barre d'échelle = 100µm.

L'expression des marqueurs du domaine dopaminergique choisis pour le criblage a été ensuite quantifiée chez les progéniteurs de chaque condition. Les progéniteurs traités en flasques ont été passés en microplaque 384 puits et fixés 24 heures après pour la quantification de ces marqueurs. Le contrôle de l'induction neurale a été effectué en quantifiant le nombre d'objets par champs valide et le pourcentage de noyaux SOX2 (Figure 57A, Figure 58a). Pour les deux lignées, la majorité des progéniteurs est positive pour le marqueur (Figure 58a). J'ai ensuite regardé le pourcentage de cellules marquées avec la colocalisation EN-1/FOXA2 chez les progéniteurs à J25 pour chaque temps de retrait de l'EGF. Je n'ai pas observé de différences avec ou sans EGF sur l'expression de ces deux marqueurs (Figure 57B, Figure 58b). Il ne semble pas non plus y avoir de différences pour l'expression du marqueurs OTX2 pour le mésencéphale et GBX2 pour le cerveau postérieur dans les deux lignées entre chacune des conditions (Figure 57C et 57D, Figures 58c, 58d, 58e et 58f).

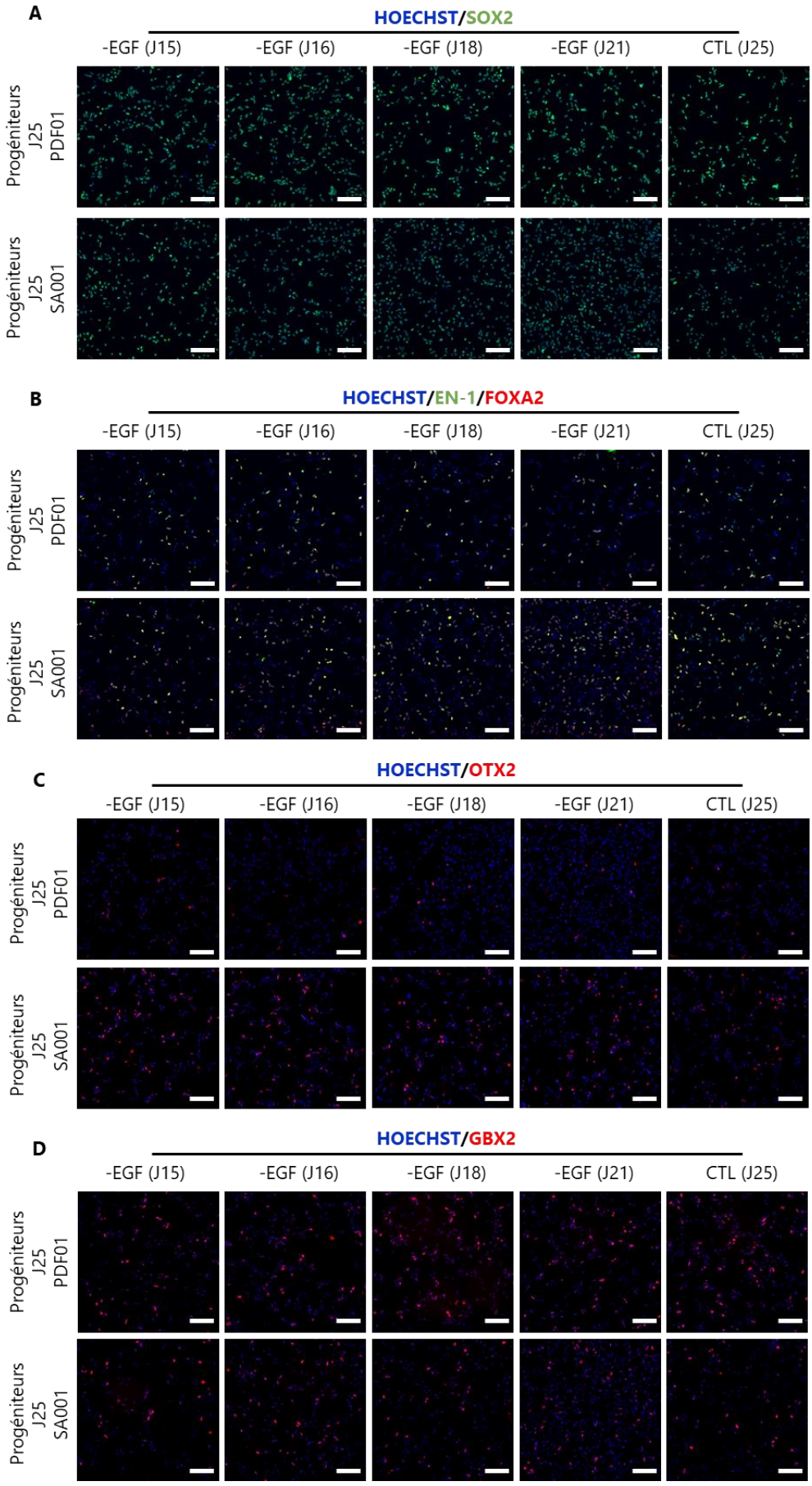

A
HOECHST/SOX2
-EGF (J15)
-EGF (J16)
-EGF (J18)
-EGF (J21)
CTL (J25)
Progéniteurs J25 PDF01
Progéniteurs J25 SA001
B
HOECHST/EN-1/FOXA2
-EGF (J15)
-EGF (J16)
-EGF (J18)
-EGF (J21)
CTL (J25)
Progéniteurs J25 PDF01
Progéniteurs J25 SA001
C
HOECHST/OTX2
-EGF (J15)
-EGF (J16)
-EGF (J18)
-EGF (J21)
CTL (J25)
Progéniteurs J25 PDF01
Progéniteurs J25 SA001
D
HOECHST/GBX2
-EGF (J15)
-EGF (J16)
-EGF (J18)
-EGF (J21)
CTL (J25)
Progéniteurs J25 PDF01
Progéniteurs J25 SA001

Figure 57 : Immunofluorescences du test de retrait de l'EGF du mix de cytokines pendant l'amplification.

Immunofluorescences des progéniteurs fixés à J25 avec retrait de l'EGF aux différents temps : J15 (ensemencement en flasque), J16 (premier changement de milieu), J18 (deuxième changement de milieu), J21 (troisième changement de milieu) et J25 (condition contrôle avec conservation de l'EGF). (A) Contrôle de l'identité des progéniteurs neuraux avec le marquage SOX2. (B) Marquages des progéniteurs dopaminergiques du MV : cellules EN-1+/FOXA2+. (C) Marquages des progéniteurs OTX2 (mésencéphale). (D) Marquages du GBX2 (cerveau postérieur). Barre d'échelle : 100 µm.

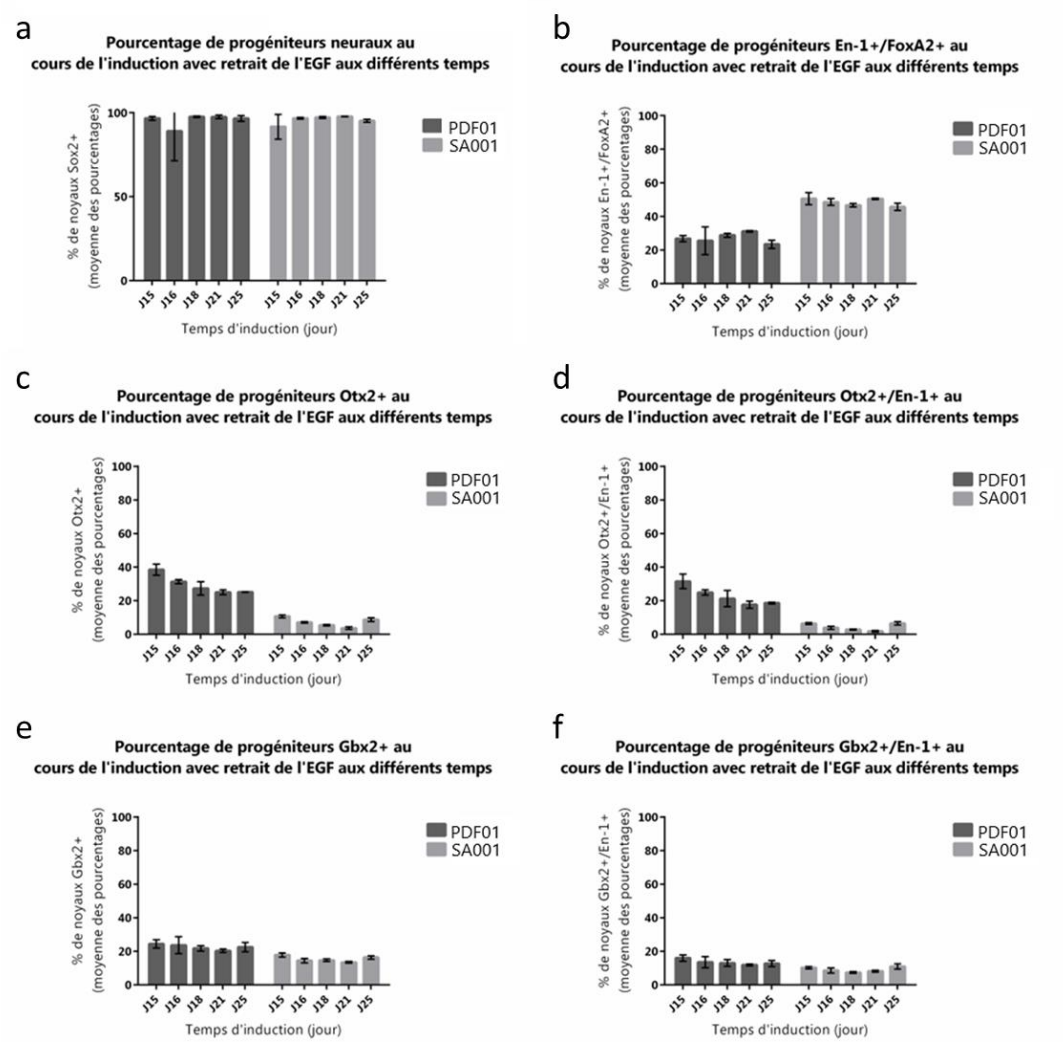


Figure 58 : Quantification des marqueurs du domaine des progéniteurs dopaminergiques du MV à J25 avec retrait de l'EGF du mix de cytokines pour les lignées PDF01 et SA001.

(a) Quantification du marqueur SOX2 chez les progéniteurs pour vérifier l'induction neurale. (b)

Quantification de l'expression de EN-1 et sa colocalisation avec FOXA2 pour l'identité MV des progéniteurs. (c) et (d) Quantification du marqueur OTX2 et de sa colocalisation avec EN-1 pour le mésencéphale.(e) et (f) Quantification du marqueur GBX2 et de sa colocalisation avec EN-1 pour le cerveau postérieur. Les graphiques représentent les moyennes de pourcentages par puits. N=4 puits par marquage pour une induction (sauf OTX2 N=2 puits).

Cet essai n'a été fait qu'une seule fois (une flasque par condition) et les quantifications ont été faites sur quatre puits. Cependant, j'ai choisi de conserver l'EGF pendant l'amplification en flasque sans refaire l'expérience, les cellules ne semblant pas ralentir leur prolifération, pour ne pas m'éloigner du protocole de base mais également pour ne pas avoir de biais lors des tests avec les composés du criblage avant les différenciations terminales. On remarque cependant que le taux de progéniteurs EN-1+/FOXA2+ est plus élevé dans l'ensemble chez la lignée SA001 que dans la lignée PDF01 (Figure 58b) et inversement pour le marqueur OTX2 (Figure 58c). Ce qui suggère que les progéniteurs induits à partir de la lignée SA001 auraient mieux maturé que ceux de la lignée PDF01. On n'observe pas de différences non plus pour le marqueur du cerveau postérieur GBX2 (Figure 58e et 58f).

3.2. Optimisation de l'entrée en différenciation des progéniteurs en neurones : inhibition de la voie de signalisation MEK/ERK

La deuxième option pour améliorer la différenciation des progéniteurs en neurones a été de bloquer la prolifération au début du protocole de différenciation. Pour cela, j'ai utilisé une molécule : l'AS703026 (Pimasertib). Cette molécule est utilisée ponctuellement dans l'équipe pour améliorer la différenciation des neurones corticaux à 50 µM pendant 48 heures au début de la différenciation, avant de continuer la différenciation avec le mélange de cytokines habituel. C'est une petite molécule inhibitrice de MEK1 et MEK2 (MEK1/2) impliqués dans la voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK, une voie notamment impliquée dans la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose.

- Essai de la molécule AS703026 à la concentration 50µM

J'ai d'abord testé le composé à la dose habituellement utilisée au sein de l'équipe (50 µM) pendant 48h de J1 à J3 de la différenciation terminale des progéniteurs induits à partir de

la lignée hiPSC PDF01 et de la lignée hESC SA001 en neurones (Figure 59).



Figure 59 : Schéma du protocole de différenciation terminale avec l'inhibiteur de la voie MEK1/2 pendant 48 heures.

L'effet de la molécule est net, on peut observer une amélioration de la visibilité et de la formation du réseau neuronal lors du suivi de la différenciation à J28 (Figure 60). Les tapis cellulaires sont moins denses, les réseaux plus nets et visibles. L'effet est visible sur les deux lignées testées (PDF01 et SA001).

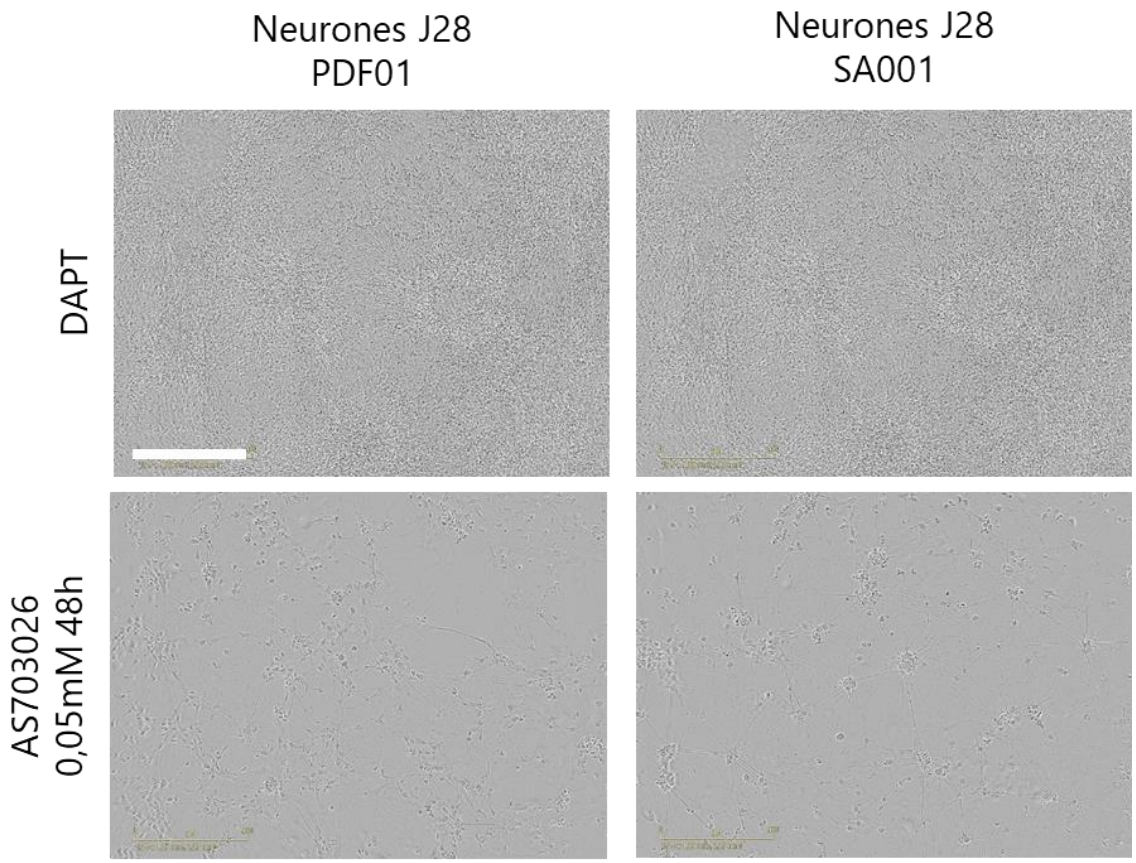


Figure 60 : Suivi de la différenciation terminale des neurones avec ou sans inhibiteur de la voie MEK1/2.

Images des neurones PDF01 et SA001 à J28 avant fixation dans la condition contrôle du protocole (DAPT) et avec l'inhibiteur. Barre d'échelle : 400µm.

L'effet sur la maturation des neurones est également visible en immunofluorescence (Figure 61A). Dans la condition contrôle (qui utilise un inhibiteur de Notch, le DAPT) les groupes de cellules sont plus denses et les marquages peuvent apparaître flous et conduire à une perte d'information. Dans la condition traitée avec l'inhibiteur de MEKs on peut voir un nombre réduit de cellules, un réseau plus visible, des neurones avec un corps cellulaire qui semblent plus gros et plus mature. Le marquage pour l'enzyme TH semble aussi être plus intense et plus net dans les neurones, de même que pour HuCD. L'amélioration de l'aspect mature des neurones permettrait également d'envisager d'aller explorer l'expression des marqueurs de la VTA et la SNpc dans la population de nDA obtenue. On peut observer l'expression de la Clb et de Girk2 dans les neurones PDF01 à J28 de la condition avec traitement (Figure 61B).

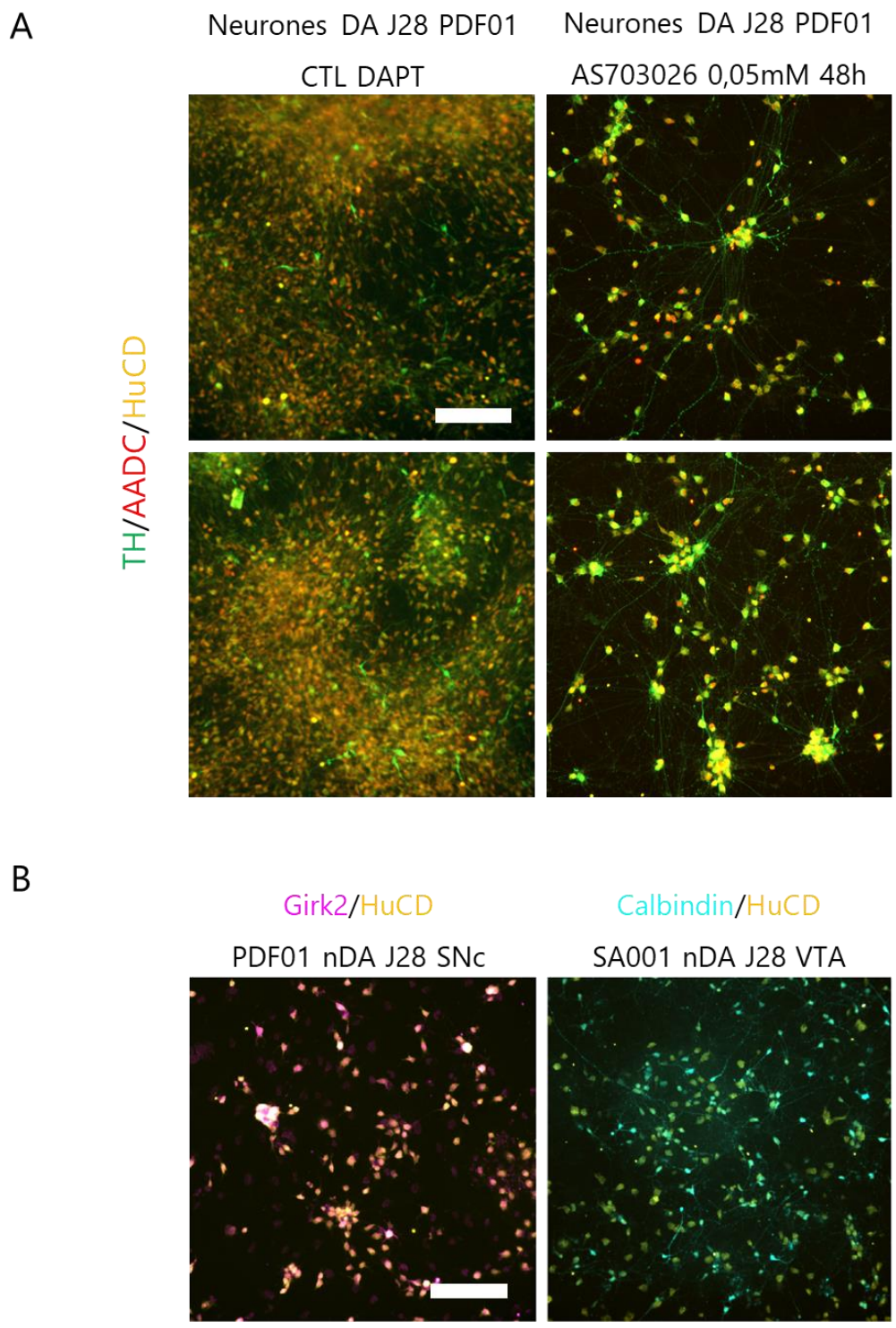


Figure 61 : Immunofluorescences de l'expression des marqueurs des nDA à J28 de différenciation dans la lignée PDF01 avec et sans traitement par l'inhibiteur MEK1/2 à 0,05mM.

(A) IF des nDA PDF01 à J28. Les cellules ont été marquées pour l'expression de la TH (vert), l'AADC (rouge) et HuCD (jaune). Les conditions avec DAPT et avec traitement avec l'inhibiteur pendant 48h à 0,05mM ont été comparées. Barre d'échelle : 100µm. (B) IF de l'expression des marqueurs Girk2 (magenta) et Clb (cyan) dans les neurones PDF01 J28 dans la condition traitée. Barre d'échelle : 100µm.

Même si l'effet est plutôt positif sur l'amélioration visuelle de la différenciation, on constate qu'il est quand même assez fort, que peu de cellules sont conservées et qu'on observe de la mortalité dans les puits. La dose testée de 0,05mM est donc peut être un peu élevée et à réadapter à nos nDA.

- Effet sur la différenciation des nDA en DR sur plusieurs jours de traitement

Afin de déterminer une concentration plus adaptée aux cellules, j'ai testé la molécule à trois concentrations pendant trois durées différentes. J'ai comparé ces nouvelles doses à la condition contrôle du protocole de base, avec du DAPT à partir de J1 dans le milieu de différenciation, et à la deuxième condition « contrôle », la molécule AS703026 à 0,05mM pendant 48 heures. Pour le choix des concentrations, j'ai dilué la concentration de moitié deux fois et testé ces concentrations tous les deux jours sur six jours (Figure 62). J'ai donc testé la molécule aux doses suivantes : 0,05mM, 0,025mM et 0,0125mM pendant 48h, 4 jours et 6 jours.

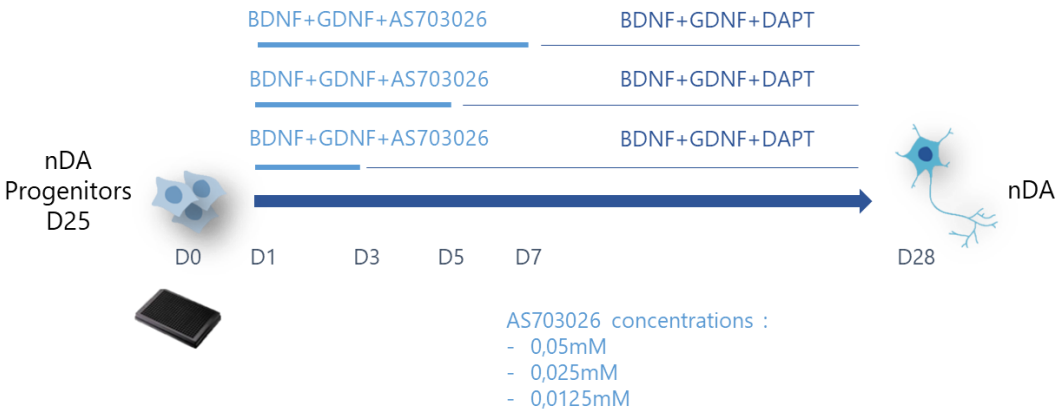


Figure 62 : Schéma du protocole de différenciation terminale avec traitement à plusieurs concentrations avec l'inhibiteur de MEK1/2.

Les résultats pour les quatre lignées à 28 jours de différenciation sont présentés dans les Figure 63 et 64, en (a) pour les neurones différenciés PDF01, en (b) pour 4603, en (c) pour

PC056 et en (d) pour SA001. Pour chaque lignée, il a fallu d'abord quantifier le nombre de noyaux par champs afin de déterminer l'effet de l'inhibiteur aux différentes concentrations sur la prolifération et une toxicité éventuelle aux fortes doses. Le nombre de neurones totaux a également été quantifié par l'expression d'HuCD ainsi que les neurones DA en regardant l'expression des cellules positives pour la colocalisation TH/HuCD/AADC. Chaque analyse a été conduite sur huit puits par condition.

On observe sur la lignée PDF01, une forte réduction du nombre de noyaux dans les conditions traitées par rapport à la condition contrôle (Figure 63a). Cette diminution du nombre de cellules est d'autant plus forte dans les conditions de traitement à 0,05mM pendant quatre et six jours. Pour ces deux doses-ci et à ces temps-là, l'inhibiteur semble avoir un effet toxique sur les cellules, ce qui semble cohérent en comparaison à la conclusion précédente sur le choix de cette dose pendant deux jours. Quand on s'intéresse au nombre total de neurones détectés par champs, on observe que quand les cellules sont traitées deux jours, le nombre de neurones ne semble pas varier, en revanche il semble diminuer pour les traitements de quatre et six jours, surtout aux concentrations de 0,05mM et 0,025mM. Pour le pourcentage de neurones exprimant les marqueurs DA matures, il semble être plus élevé dans les conditions traitées par rapport au contrôle (Figure 63a).

Pour les neurones à J28 différenciés à partir des progéniteurs de la lignée PC056, on peut observer un comportement ressemblant à la lignée PDF01. La dose de 0,05mM est trop forte au temps 4 jours et six jours. Le nombre de neurones totaux ne semble pas varier aux doses 0,025mM et 0,0125mM. Le nombre de neurones matures DA semble être un peu plus élevé pour les cellules traitées deux jours et quatre jours (Figure 63c).

Une des lignées hiPSC ne semble pas avoir réagi aux traitements avec l'inhibiteur de la voie MEK1/2, la 4603. On observe quand même une légère diminution du nombre de neurones pour les temps quatre et six jours à 0,05mM. En revanche il n'y a pas de différence entre les pourcentages de neurones totaux (environ 40%) et pour les nDA (environ 20%) pour toutes les conditions (Figure 63b).

Enfin, concernant les neurones différenciés à partir de la lignée SA001, on constate également que pour les trois temps de traitement la concentration 0,05mM semble trop forte en particulier pendant quatre et six jours. On retrouve une diminution du nombre de neurones

totaux pour ces deux dernières conditions. En revanche, il ne semble pas y avoir d'augmentation des neurones totaux par rapport au contrôle pour les autres conditions, mais une légère augmentation des nDA (Figure 63d). Notons que pour la lignée SA001, il y a eu des décollements de tapis cellulaire dans certains puits ce qui diminue le nombre de puits pour l'analyse (0,0125mM pendant 48 heures = 5 puits ; 0,025mM pendant quatre jours =7 puits ; 0,0125mM pendant quatre jours = 5 puits ; 0,0125mM pendant 6 jours = 7 puits).

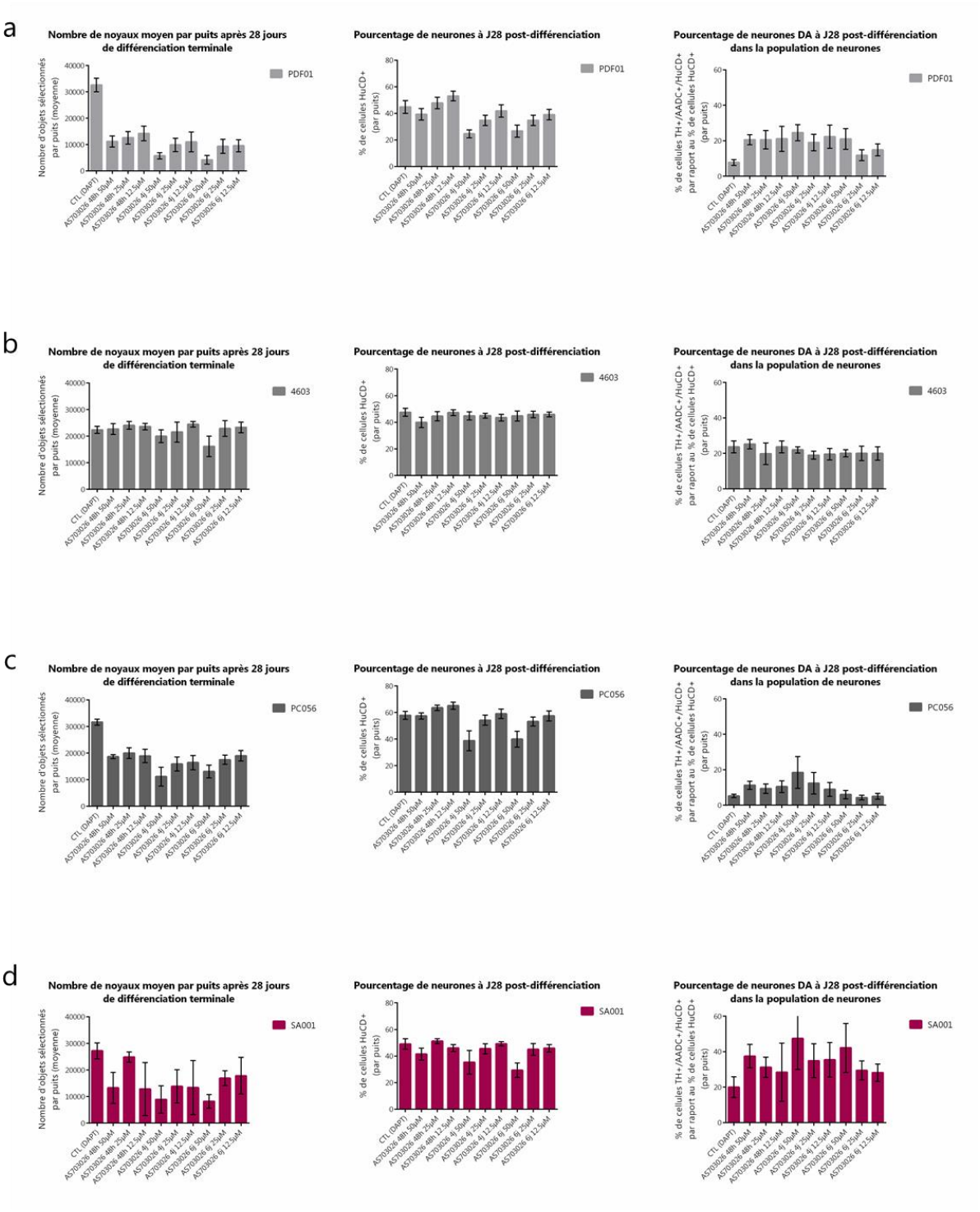


Figure 63 : Résultats du test de concentration de l'inhibiteur de la voie MEK1/2 pendant la différenciation terminale (1/2).

Pour chaque lignée sont représentés sur cette figure : la moyenne du nombre de cellules par puits, le pourcentage de neurones totaux (cellules HuCD+) et le pourcentage de nDA (cellules TH+/AADC+/HuCD+). (a) Les résultats pour la lignée PDF01. (b) Les résultats pour la lignée 4603. (c) Les résultats pour la lignée PC056. (d) Les résultats pour la lignée SA001. Traitements réalisés en

quadruplicats. Les acquisitions et analyses ont été réalisées sur 4 puits pour chaque condition pour chaque lignée.

Pour évaluer la maturation des neurones il faut également regarder un élément important : l'aire des corps cellulaires. En se différenciant les neurones ont des corps cellulaires qui deviennent plus volumineux. On ne voit toujours pas d'effet pour la lignée 4603 (Figure 64b). On observe en revanche, une augmentation de l'aire des objets HuCD (corps cellulaires des neurones totaux) et des objets TH dans toutes les conditions traitées par rapport au DAPT pour la lignée PDF01 (Figure 64a). La même observation est faite pour les neurones de la lignée PC056 avec un différentiel de taille moins important et plutôt pour les traitements de 48 heures et 4 jours (Figure 64c). Enfin, pour les neurones de la lignée SA001, on constate également une légère augmentation des aires des objets HuCD et TH sauf à la dose de 12,5 µM (Figure 64d).

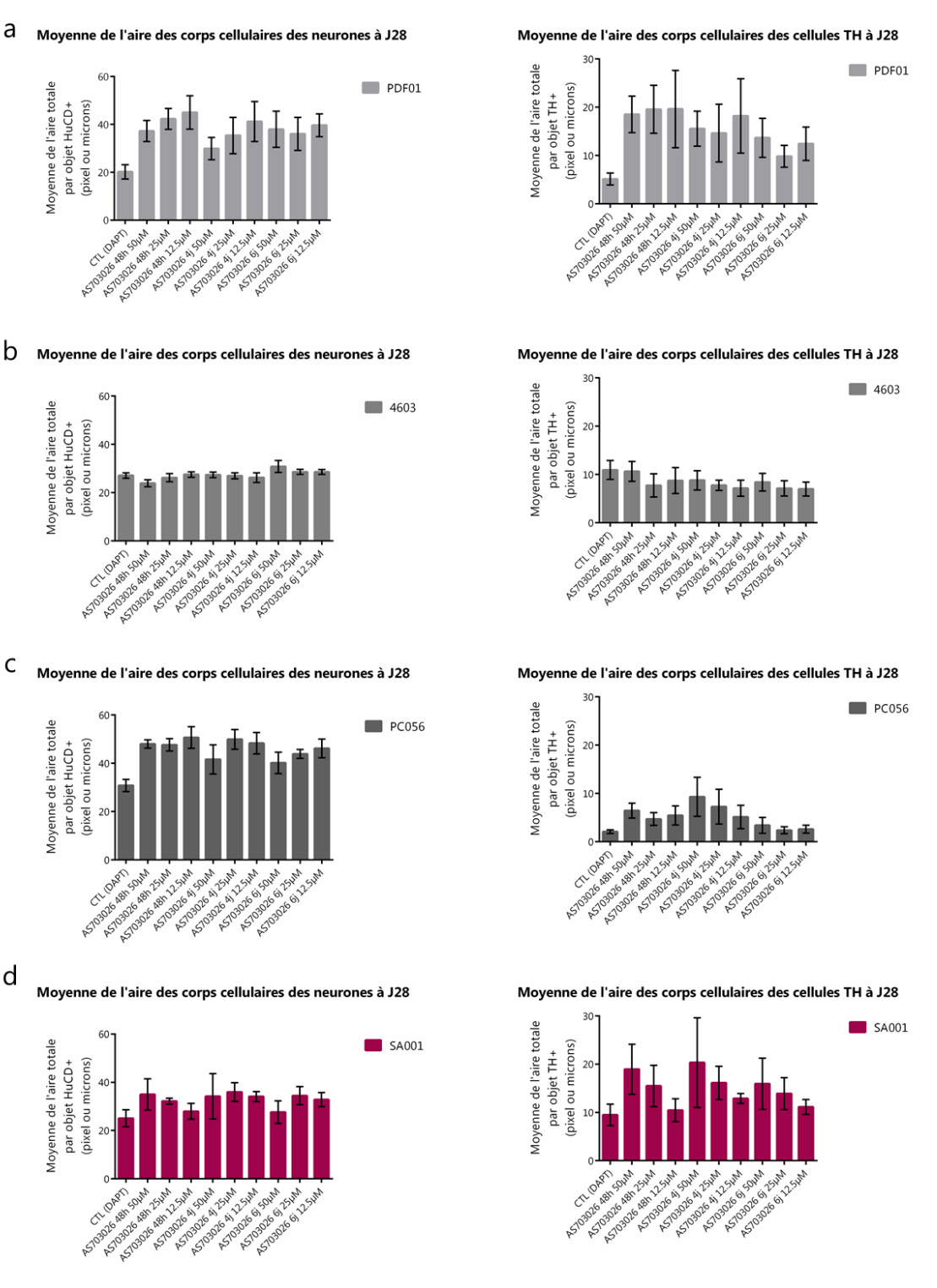


Figure 64 : Résultats du test de concentration de l'inhibiteur de la voie MEK1/2 pendant la différenciation terminale (2/2).

Moyenne de l'aire des objets HuCD+ et TH+ après 28 jours de différenciation avec traitement à différentes concentrations. (a) Les résultats pour la lignée PDF01. (b) Les résultats pour la lignée 4603. (c) Les résultats pour la lignée PC056. (d) Les résultats pour la lignée SA001. Traitements réalisés en

quadruplicats. Les acquisitions et analyses ont été réalisées sur 4 puits pour chaque condition pour chaque lignée.

En croisant les résultats des quantifications et des immunofluorescences pour l'aspect des neurones, un traitement de deux ou de quatre jours semblerait être le moins toxique pour les cellules et le plus efficace pour améliorer la maturation de la population de neurones immatures (conservation d'un pourcentage en neurones totaux équivalente à celle de la condition DAPT). La concentration initiale de 50 µM est trop forte pour des temps de traitement de 4 et 6 jours même si on peut observer une augmentation du nombre de neurones DA quantifié chez les lignées PDF01 et SA001, l'effet toxique sur le réseau neuronal est visible sur les IF (Figures 65 et 66). En se concentrant sur les doses 0,025mM et 0,0125mM on peut observer une diminution du nombre de noyaux dans la majorité des lignées, celles-ci semblent donc plus efficaces pour améliorer la maturation des neurones.

Un traitement de deux ou quatre jours à une de ces deux concentrations semblerait être le plus adapté pour, à la fois ne pas affecter la quantité de neurones totaux, tout en améliorant la maturation (augmentation de l'aire des corps cellulaire des noyaux et plus de neurones matures exprimant les marqueurs DA). En regardant les IF des neurones à J28 et en croisant l'aspect visuel des neurones avec les résultats précédents, trois conditions pourraient être retestées : 0,0125mM pendant 2 jours ; 0,0125mM pendant 4 jours et 0,025mM pendant 2 jours.

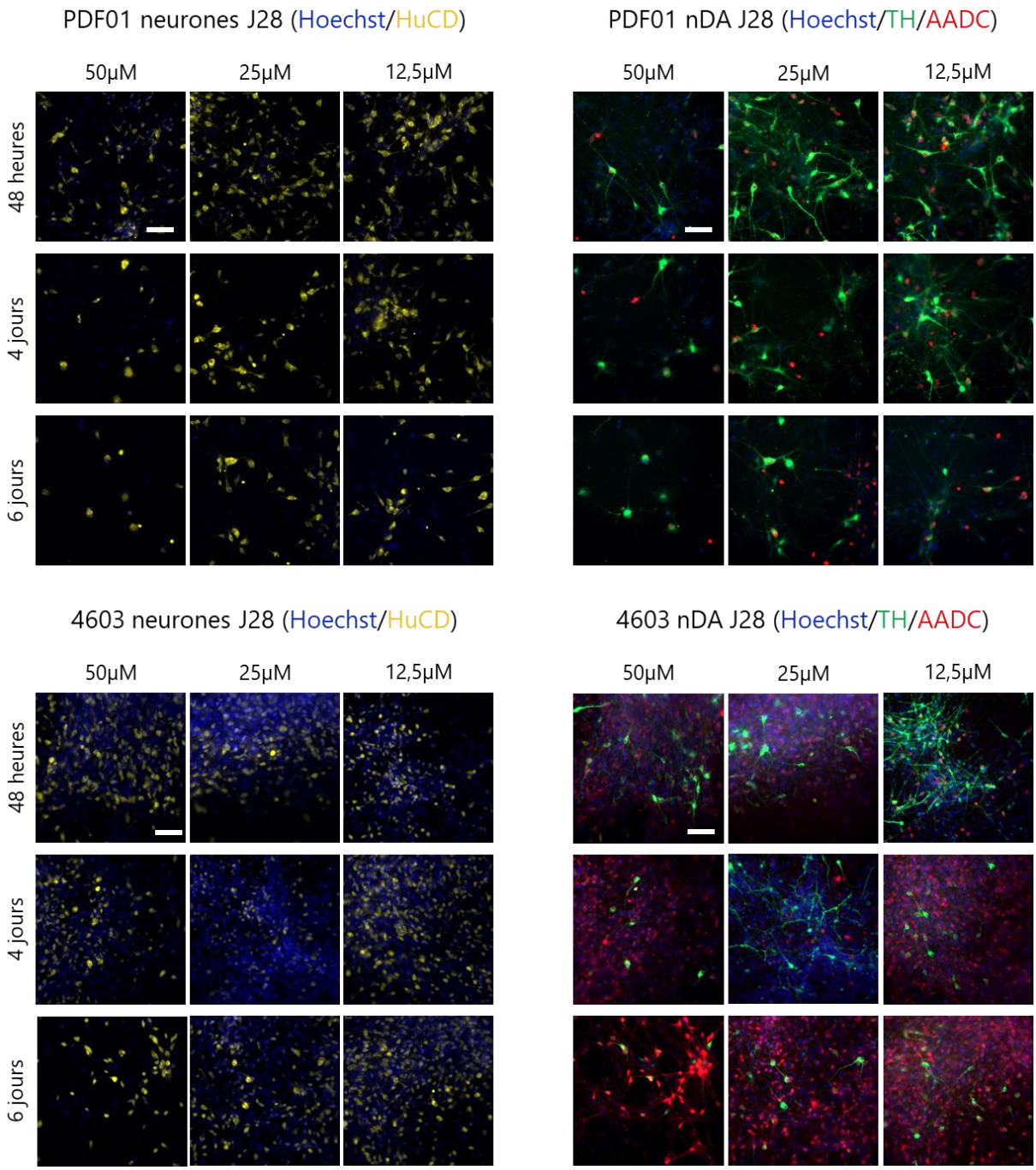


Figure 65 : Immunofluorescences des neurones J28 après traitements avec l'inhibiteur de MEK1/2 pendant différents temps (1/2).

IF des neurones à J28 pour les lignées PDF01 et 4603. La TH est en vert, AADC en rouge et HuCD en jaune. Les noyaux sont marqués au Hoechst (bleu). Barre d'échelle : 50µm.

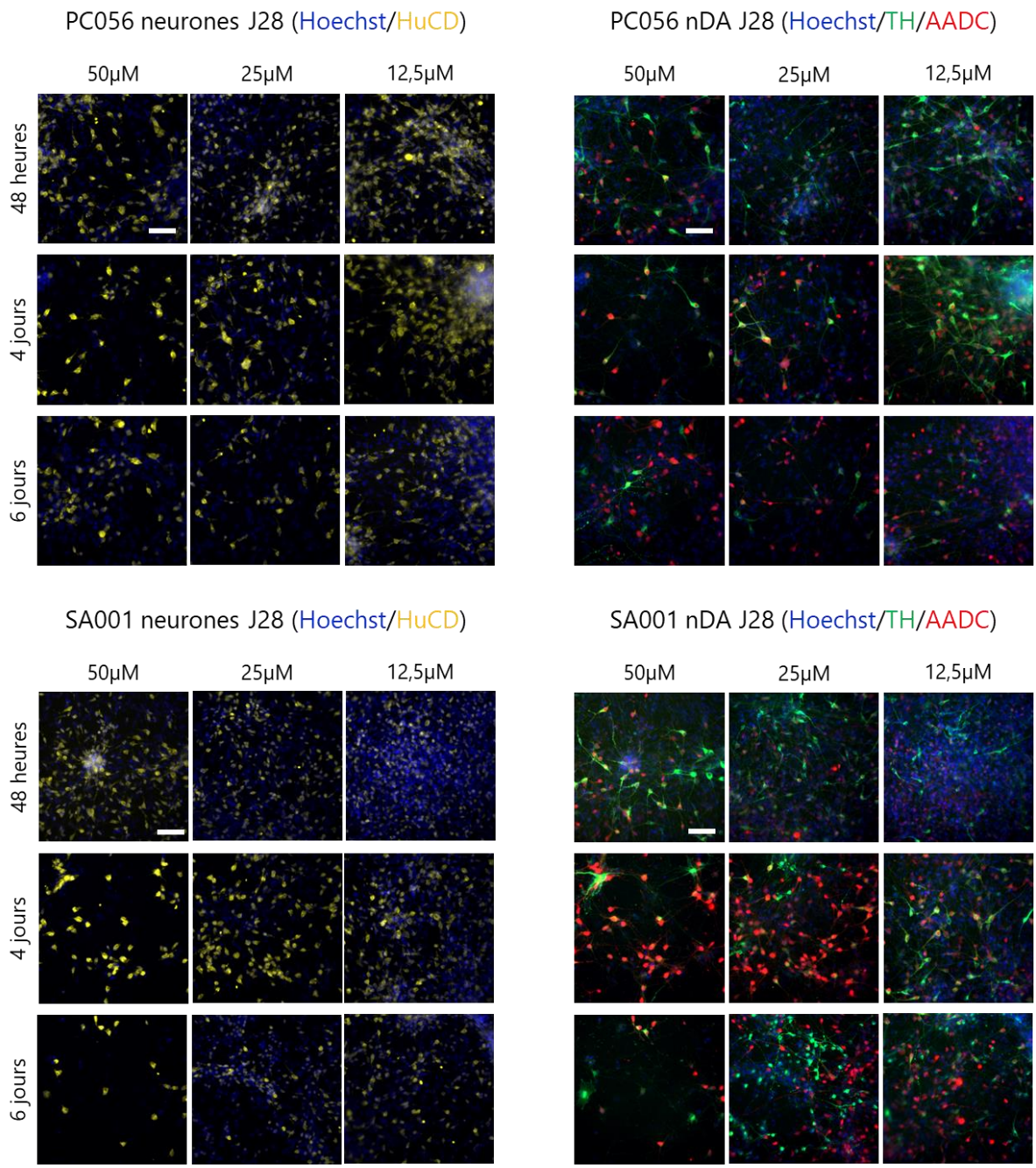


Figure 66 : Immunofluorescences des neurones J28 après traitements avec l'inhibiteur de MEK1/2 pendant différents temps (2/2).

IF des neurones à J28 pour les lignées PC056 et SA001. La TH est en vert, AADC en rouge et HuCD en jaune. Les noyaux sont marqués au Hoechst (bleu). Barre d'échelle : 50µm

3.3. Etude préliminaire de l'expression des récepteurs à l'adénosine dans la lignée PDF01

Le composé 08 est un agoniste du Rc A3 de l'adénosine. L'expression du Rc A3 a déjà été

observée en IF dans la Figure 50. Afin de mieux valider l'expression et observer la répartition du Rc dans les progéniteurs, une IF a été réalisée toujours sur les progéniteurs PDF01 à J16 (Figure 67A et 67B) mais cette fois-ci les images ont été acquises au 40X (immersion à l'huile). Les trois autres Rc à l'adénosine ont également été marqués pour étudier leur expression en IF dans les progéniteurs à J16 et valider les anticorps.

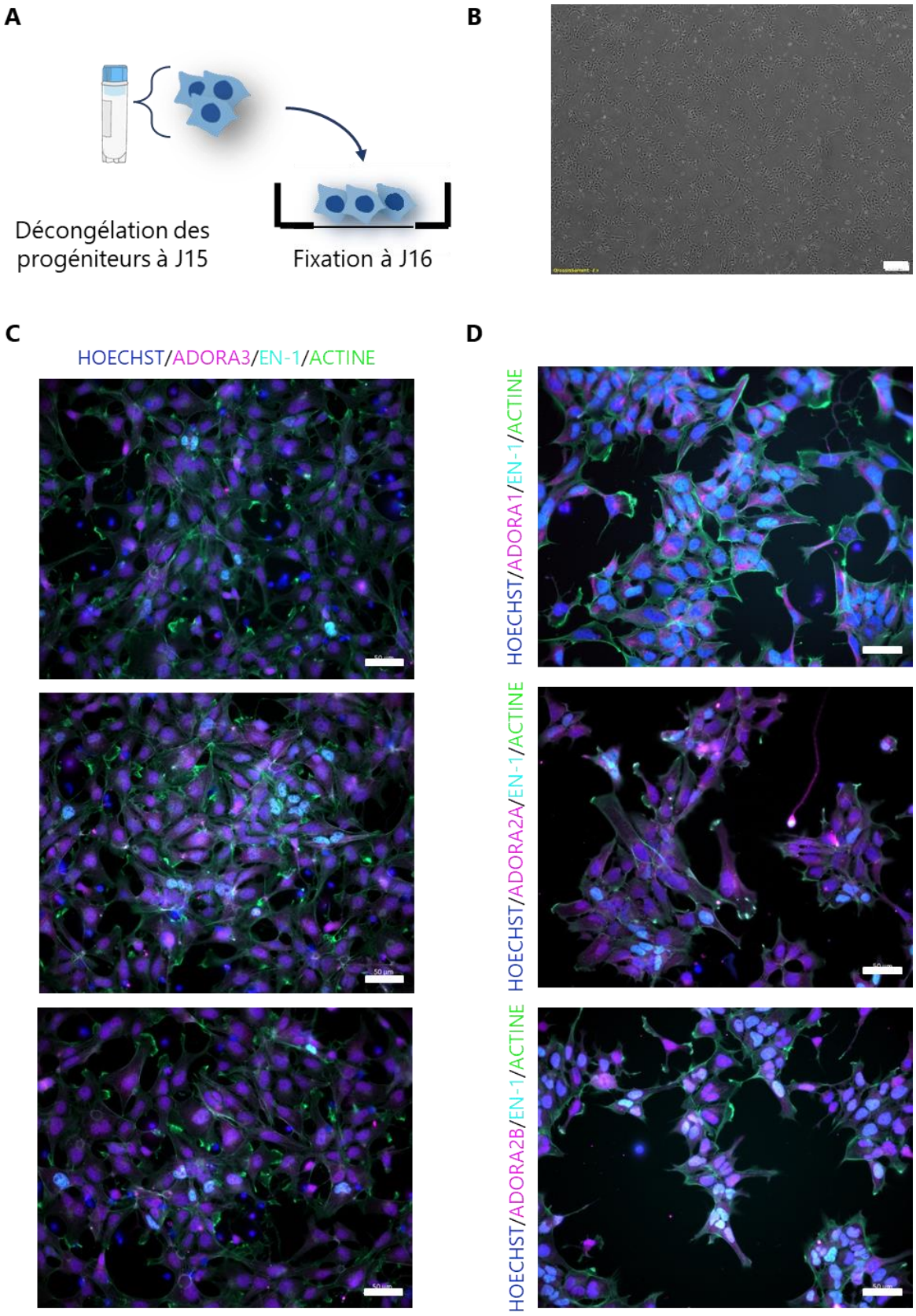


Figure 67 : Etude de l'expression des protéines ADORA par IF sur les progéniteurs J16 de la lignée PDF01.

(A) Décongélation dans des µ-Dish ibiTreat (ibidi®) des progéniteurs induits à partir de la lignée PDF01 à J15, puis fixation des cellules à J16 pour marquage. (B) L'adhésion des cellules sur le « coating » de PO-Lam est contrôlée avant fixation. Barre d'échelle = 200 µM. (C) Immunofluorescence de la validation des anticorps anti-ADORA3 à J16. (D) Immunofluorescence de la validation des anticorps anti-ADORA1, ADORA2A et ADORA2B dans les progéniteurs à J16. Les noyaux sont marqués au hoechst (bleu), les filaments d'actine F à la phalloïde-488 (vert), les progéniteurs du MV sont identifiés par le marqueur EN-1 (cyan) et les Rc ADORA sont identifiés en magenta. Barre d'échelle = 50 µm.

Le marquage A3 parait plus léger dans le cytoplasme mais également plus fort « par-dessus » le noyau (Figure 67C). On observe la présence du marquage au récepteur A1 dans le cytoplasme et surtout plus concentré en périnucléaire dans certaines cellules (Figure 67D). Les marquages A2A et A2B (Figure 67D) semblent plus diffus dans le cytoplasme autour du noyau. Ces IF permettent de valider les marquages des anticorps pour ces références dans nos progéniteurs PDF01.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1. Modulation de la genèse des nDA par un agoniste adénosinergique

1.1. Résultats des travaux de thèse

Le criblage nous a permis d'identifier une molécule potentielle pour améliorer la genèse des nDA : le composé numéro 8. Cette molécule s'est avérée être également efficace pour restaurer le pourcentage de progéniteurs dopaminergiques des nDA et des nDA dans une lignée modèle de la maladie de Lesch-Nyhan. Le C08 ou 1-Deoxy-1-[6-[[(3-iodophenyl)methyl]amino]-9H-purin-9-yl]-N-methyl-β-D-ribofuranuronamide, est une molécule dérivée de l'adénosine et un agoniste du Rc A3 (Figure 68). Il est également appelé IB-MECA, ou selon le déposant CF-101 ou piclidenoson (Fishman, 2022).

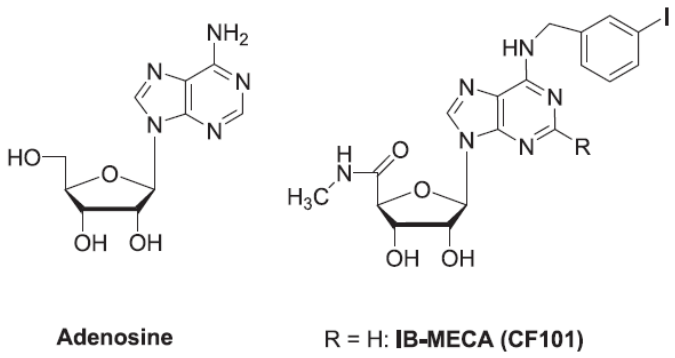


Figure 68 : Structure du composé 08 et de l'adénosine.

(Source : Modifié de Borea et al., 2015).

1.2. Le Rc à l'adénosine ADORA3

Le Rc A3 de l'adénosine fait partie de la famille P1 des Rc aux purines. Il existe deux grandes familles de Rc aux purines, les Rc P1 (à l'adénosine) et les Rc P2 (aux nucléotides diphosphates et triphosphates : ATP, ADP, UTP et UDP). Dans les Rc P1 on retrouve les quatre Rc à l'adénosine A1, A2A, A2B et A3. Ce sont des Rc couplés à une protéine G et qui vont agir sur l'adénylate cyclase (AC, Figure 69). A1 et A3 vont inhiber l'AC et diminuer le taux d'AMPc tandis que les deux Rc A2 vont activer l'AC et entraîner une augmentation de la conversion de l'AMP en AMPc (Borea et al., 2015; Burnstock, 2018; Coppi et al., 2022). La deuxième famille est

composée des Rc aux nucléotides P2X (sept sous-types) et P2Y (huit sous-types), des Rc couplés à un canal ionique pour les premiers et des Rc couplés à une protéine G pour les seconds (Burnstock, 2018; Oliveira et al., 2016).

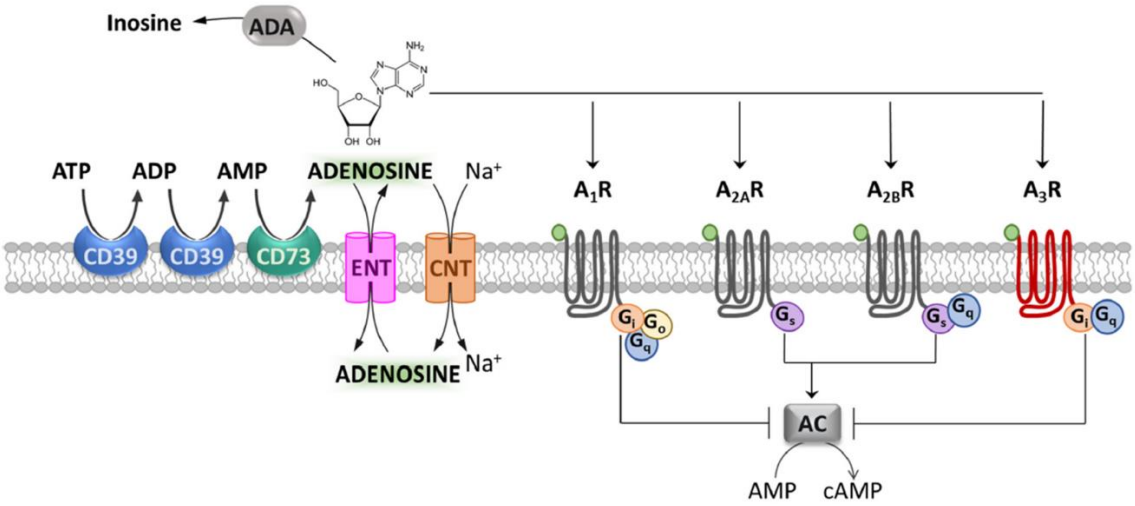


Figure 69 : Schéma représentant le transport de l'adénosine et ses Rc.

(Source : Coppi et al., 2022).

Parmi les Rc P1, le récepteur A3 est le dernier à avoir été décrit (Zhou et al., 1992) et c'est le Rc dont la distribution et la pharmacologie présente le plus de variabilité entre les espèces avec 70% environ d'homologie de séquence entre les rongeurs et les primates (Coppi et al., 2022; Gao et al., 2022). Aujourd'hui, ce Rc est connu pour être exprimé à divers endroits dans l'organisme dont le SNC ou en périphérie. On le retrouve notamment chez l'Homme au niveau des cellules épithéliales de certains organes, des cellules médiatrices de l'inflammation, de la rate, des testicules, de l'utérus, et, avec des niveaux d'expression plus faibles dans le cœur, le cerveau et les poumons (Borea et al., 2018). Dans le cerveau, il est exprimé dans plusieurs structures dont le thalamus, l'hippocampe, le cortex, le mésencéphale, la microglie, les oligodendrocytes et les astrocytes (Sources : https://www.proteinatlas.org/ENSG00000282608-ADORA3/brain; Borea et al., 2015, 2018; Cherchi et al., 2021; Haeusler et al., 2015). Le Rc A3 aurait également un rôle fonctionnel dans la régulation de la pression intraoculaire, l'activation des cellules gliales ainsi que dans la vasoconstriction dans le système cardiovasculaire (Borea et al., 2015). On le retrouve surexprimé dans les cellules cancéreuses des tumeurs solides (sein,

mélanome, carcinome pancréatique et pulmonaires à petites cellules, colon) et chez des patients avec des pathologies inflammatoires (Coppi et al., 2022; Fishman, 2022; Fishman et al., 2012). L'intérêt pour ce Rc a d'ailleurs grandi ces dernières années pour son potentiel thérapeutique dans certaines de ces pathologies cancéreuses, inflammatoires ou auto-immunes. En effet, bien qu'il semble peu exprimé dans le cerveau il serait impliqué dans des processus de neuroprotection notamment dans les traumatismes cérébraux et dans la phase précoce suivant une ischémie. Il jouerait également un rôle dans la réduction de la douleur (dont chronique), la bronchoconstriction ainsi que dans des processus anti-inflammatoires et d'immunomodulation (Abbracchio & Cattabeni, 1999; Borea et al., 2015; Bozdemir et al., 2021; Coppi et al., 2021, 2022; Farr et al., 2020; Fishman et al., 2012; Jacobson et al., 2018; Kim et al., 2012; Pedata et al., 2016). Des essais cliniques sont d'ailleurs en cours avec des agonistes du Rc A3 pour traiter la polyarthrite rhumatoïde (PAR), le psoriasis en plaque, la stéatose hépatique non alcoolique ou le carcinome hépatocellulaire (Borea et al., 2018; Fishman, 2022). Un de ces agonistes est le CF-101, pour les essais sur la PAR et le psoriasis (Bar-Yehuda et al., 2007; Borea et al., 2018; Fishman, 2022).

Il serait intéressant de tester d'autres molécules agonistes du Rc A3 pour voir si l'effet d'augmentation du pourcentage de progéniteurs EN-1+/FOXA2+ et des neurones TH+/AADC+ est retrouvé chez les lignées « wild-type » et les lignées modèles LND. Pour commencer, les autres agonistes A3 contenus dans la banque pourraient être testés à une autre dose que celles du criblage puisqu'ils n'ont pas été retenus, ainsi que ceux en plus décrits dans Fishman et al., 2012. Il existe également des antagonistes connus des Rc A3 (Borea et al., 2018). Ces molécules pourraient également être testées sur notre modèle afin de voir s'il est possible de moduler dans le sens inverse le pourcentage de progéniteurs EN-1+/FOXA2+. Il serait également intéressant de regarder les conséquences du traitement avec le composé sur les autres populations de progéniteurs et de neurones retrouvées à la fin des protocoles de différenciation. En effet, comme expliqué dans la catégorie Résultats, le protocole de différenciation nous permet d'obtenir d'autres populations qui émergent proches de la barrière mésencéphale/rhombencéphale dont les neurones 5-HT, les neurones oculomoteurs et les neurones du noyau rouge. Comme le pourcentage de neurones totaux ne semble pas être affecté, il serait intéressant de regarder si l'augmentation des nDA se fait au détriment d'une autre population ou si l'effet du composé serait plutôt un effet d'amélioration de la maturation

ou du maintien des neurones permettant une meilleure expression des marqueurs. Ces expériences devraient être faites avec les lignées contrôles et LND, puisque les populations dopaminergiques, sérotoninergiques ainsi que les neurones non dopaminergiques du mésencéphale semblent être impliqués dans la pathologie, en quantifiant les marqueurs GBX2, Nkx2.2 et TPH2 pour les populations sérotoninergiques et Nkx6.1, Islet-1 et FOXA2 pour les populations non dopaminergiques du mésencéphale (García et al., 2012; Saito & Takashima, 2000; Witteveen et al., 2022). Enfin il est possible grâce à la technique immuno-enzymatique ELISA de mesurer le taux de DA dans le surnageant des cultures. Pour confirmer l'effet de l'augmentation du nombre de nDA cette technique pourrait être employée pour regarder si le taux de DA est augmenté dans les puits contenant les cellules ayant été traitées avec le C08.

1.3. Hypothèses mécanistiques

Action sur la libération de la β-caténine

Un premier mécanisme envisagé pour expliquer l'effet du C08 sur les progéniteurs et les nDA est son action sur la glycogène synthase kinase 3β (GSK-3β) et la β-caténine qui pour rappel appartiennent aussi à la cascade de signalisation de la voie Wnt/β-caténine, une des voies essentielles dans la régionalisation du cerveau et la spécification du domaine des nDA (Brodski et al., 2019; Kirkeby et al., 2012). En activant le Rc A3, le C08 entraînerait une diminution de la formation d'AMPc en inhibant l'AC. L'AMPc active la PKA, sa diminution va donc entraîner une diminution de l'activité des protéines kinases A et B, et entraîner une diminution de la phosphorylation de la GSK-3β. Dans la voie canonique Wnt/β-caténine, la GSK-3β appartient à un complexe qui séquestre la β-caténine phosphorylée ce qui conduit à sa dégradation dans le cytoplasme par le protéasome. Lorsque la voie est activée, le complexe est dissocié et la β-caténine (alors non-phosphorylée) se retrouve sous forme stabilisée et peut alors transloquer dans le noyau et se lier aux facteurs de transcription ciblés (Brodski et al., 2019). Ici, lors de l'activation du Rc A3, l'augmentation de la forme active de la GSK-3β entraînerait alors une augmentation de la phosphorylation de la β-caténine et donc de sa dégradation et une diminution de sa translocation dans le noyau (Figure 70) (Borea et al., 2015; Fishman et al., 2012).

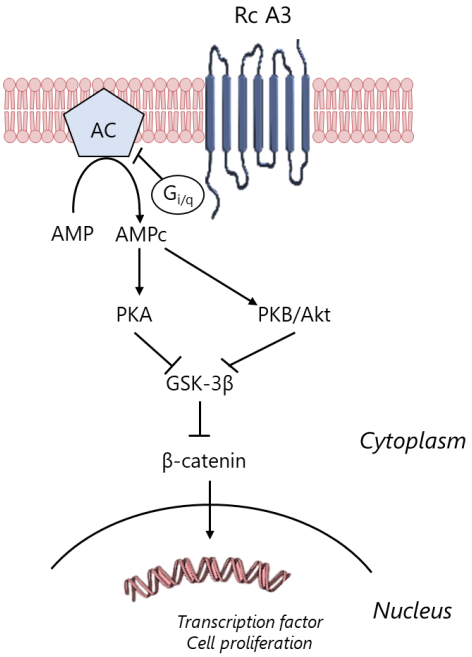


Figure 70 : Schéma simplifié des voies de signalisation agissant sur la β-caténine lors de l'activation du Rc par un agoniste A3.

(Source : Adapté de Fishman et al., 2012).

Pour la suite il serait envisageable de quantifier la β-caténine et sa translocation ou non dans le noyau en comparant ses fractions nucléaire et cytoplasmique en Western Blot avec et sans traitement avec le C08 sur les progéniteurs pour voir si l'on observe des modulations au niveau de la signalisation. Une quantification de l'Akt pourrait également être réalisée.

Voie de l'adénosine

La deuxième hypothèse mécanistique pour expliquer l'action de la molécule dans l'augmentation de la genèse des progéniteurs dopaminergiques du MV est que la molécule pourrait agir comme un « donneur » d'adénosine. En effet, le Rc A3 possède une action inhibitrice sur l'AC et va donc empêcher la conversion de l'AMP en AMPc (Borea et al., 2015; Coppi et al., 2022). L'action agoniste du C08 pourrait alors permettre d'augmenter l'AMP disponible dans le cytoplasme, AMP qui peut ensuite rentrer soit dans le cycle des purines via sa conversion en IMP soit dans la formation d'adénosine qui elle-même peut être convertie en inosine retrouvée dans la voie de recyclage des purines (Visser & Jinnah, 2020).

Dans des travaux de thèse publiés précédemment dans l'équipe (Ruillier et al., 2020), le

criblage à haut débit de molécules sur des NSC dérivées à partir de CSPh avait permis d'identifier six composés capables de restaurer la survie et le phénotype dans les lignées modèles de la LND. Ces six composés dont la SAM contenaient tous une part dérivée de l'adénosine. L'hypothèse de mécanisme d'action privilégiée était que les six molécules pourraient en étant dégradées libérer de l'adénosine qui serait alors mise à disposition dans le cycle des purines. Concernant la SAM, il a déjà été évoqué dans l'introduction que cette molécule avait montré des effets bénéfiques sur les troubles comportementaux de patients LND et dans la dépression (Bell et al., 2016; Caruso et al., 1984; B. C. Chen et al., 2014; Cuomo et al., 2020; Dolcetta et al., 2013; Harris, 2018; Lauber et al., 2017; Madeo et al., 2019; Momosaki et al., 2019). La SAM agit comme un donneur de méthyle dans des réactions de transméthylation largement impliquées dans les fonctions de l'organisme. Sa conversion en SAH puis en homocystéine et en adénosine de façon réversible lui permet également de fournir de l'adénosine pour le cycle des purines (Francioso et al., 2021). De plus, une altération de son métabolisme pourrait apparaître avec l'âge et sa déficience pourrait être impliquée dans des pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Francioso et al., 2021). La SAM est également un précurseur du glutathion et pourrait jouer un rôle dans les processus de stress oxydatif (Francioso et al., 2021).

Il serait intéressant de tester la SAM en combinatoire avec le C08 pour voir s'il existe un effet synergique entre les deux composés dans les lignées CSPh « wild-type » et les lignées modèles de patients et un effet sur la genèse des nDA. Des quantifications de l'adénosine, de l'AMP et de l'AMPc pourraient être ajoutées en complément de la quantification des marquages d'immunofluorescence EN-1/FOXA2 à J25 chez les progéniteurs pendant les traitements avec le C08.

1.4. Purines et neurodéveloppement

Pour faire la preuve de principe de la pertinence de ce test de criblage pour étudier la modulation de la genèse des nDA, nous avons choisi la MLN et les voies purinergiques. La MLN n'est pas la seule pathologie affectant le métabolisme des purines, il existe d'autres pathologies neurodéveloppementales pour lesquelles des perturbations du métabolisme des purines et des nucléotides en général sont impliquées ou supposées impliquées. On retrouve comme pathologies de ces troubles métaboliques, aux conséquences neuropsychiatriques et motrices,

le déficit en ADSL, en ADA, le syndrome de Down, les troubles du spectre autistique (Fumagalli et al., 2017). Ces pathologies affectent plus de 80 millions de personnes dans le monde (Cheffer et al., 2018).

Les purines, l'adénosine et les nucléotides comme l'AMP, l'ADP ou l'ATP, sont libérés ou utilisés comme cofacteurs dans des voies métaboliques dont les voies impliquant les neurotransmetteurs : DA, sérotonine, GABA, glutamate, noradrénaline ou l'acétylcholine dans le système nerveux (Burnstock et al., 2011). En plus des composants des voies métaboliques, les Rc purinergiques P1 et P2 sont impliqués (ou suspectés impliqués) dans plusieurs de ces pathologies psychiatriques. C'est le cas pour la dépression, la schizophrénie, les troubles bipolaires, les TSA, l'anxiété, les TDAH ou encore le SGT (Cheffer et al., 2018). En effet, les variations en acide urique retrouvées dans les TDAH, la dépression ou les troubles bipolaires s'accompagnent de perturbations de l'expression des Rc purinergiques A2A et P2X7 ainsi que de l'adénosine (Bartoli et al., 2020; Cheffer et al., 2018). Un rôle du Rc A1 a été également évoqué dans les TDAH, la schizophrénie, les TSA (Cheffer et al., 2018). Des polymorphismes de type SNP des gènes codant pour ces Rc, notamment le P2Y7 seraient associés à une vulnérabilité accrue de développer une grande partie de ces troubles ou d'en moduler la symptomatologie (Cheffer et al., 2018). Ces implications en font d'ailleurs, avec les Rc A1, des cibles thérapeutiques privilégiées pour ces pathologies. Enfin, on retrouve à nouveau les Rc A2A et P2Y7 ainsi que les Rc A1 et P2Y1/2, impliqués dans des maladies neurodégénératives ou auto-immunes comme Parkinson, la maladie de Huntington, la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique ou encore la sclérose en plaque (Burnstock, 2016). Certains symptômes de ces pathologies s'expliqueraient par l'association des Rc A2A avec les Rc D_2 dans la voie indirecte des ganglions de la base (Cheffer et al., 2018).

Le rôle du Rc A3 dans ces pathologies est peu documenté, si ce n'est que des variants du Rc (Leu90Val et Val171Ile) le rendant hyperfonctionnel ont été identifiés dans des TSA et des troubles obsessionnels compulsifs (Campbell et al., 2013; Cheffer et al., 2018; Zhu et al., 2011). Par ailleurs, le Rc A3 agirait sur l'expression des transporteurs sélectifs de la sérotine (SERT) et son activation augmenterait l'expression de ceux-ci et par conséquent la recapture de la sérotonine. En présence du variant Leu90Val, il a été observé lors de la stimulation du Rc A3 par l'agoniste IB-MECA une récupération prolongée de l'activité de recapture de la sérotonine, ce qui suggère un lien entre les différents systèmes sérotoninergiques et

adénosinergiques avec l'implication potentielle du Rc A3 dans les TSA et potentiellement dans les troubles affectant ces systèmes (Campbell et al., 2013; Cheffer et al., 2018; Zhu et al., 2011).

La variabilité des symptômes et des troubles résultants des altérations des voies purinergiques n'est pas si étonnante étant donné l'implication des voies purinergiques dans le développement. Les voies purinergiques sont présentes dans l'organisme dès le développement embryonnaire et ce, dans de nombreux tissus. Elles sont impliquées dans le développement du système nerveux central et diverses fonctions du métabolisme cellulaire (Burnstock, 2020). Au cours du développement les voies purinergiques vont agir sur l'organogenèse, la synaptogenèse et le développement des cellules gliales (astrocytes et oligodendrocytes). On retrouve les Rc P2X et P2Y exprimés à la surface des NSC en fonction de leur stade de développement. L'activation de ces Rc va entraîner la régulation de la prolifération et de la différenciation des neurones ou des cellules gliales, mais également leur maturation et migration dans le cerveau. Ainsi, par exemple, les Rc P2Y1 sont impliqués dans la migration des neuroblastes et la spécification des différentes couches corticales. Les Rc P2 vont également être impliqués dans la prolifération des précurseurs des oligodendrocytes, de leur maturation et dans la myélinisation. Enfin, les Rc P1 (A1 et A2A) sont impliqués dans la neurotransmission en activant ou inhibant la libération des neurotransmetteurs comme la DA ou le glutamate. Le Rc A2 est aussi impliqué dans la mise en place de la guidance axonale et sur la croissance des neurites (Burnstock, 2016; Fumagalli et al., 2016, 2017; Heine et al., 2016; Lecca et al., 2016; Oliveira et al., 2016). Concernant les Rc A2B et A3, leur rôle au cours du développement et de la neurogenèse reste encore à explorer (Fumagalli et al., 2017).

Ce qui est intéressant c'est que le C08 est un agoniste du Rc A3 dont le rôle dans le développement est encore peu connu. Explorer les mécanismes d'action de cette molécule permettant potentiellement d'améliorer la genèse des nDA permettrait d'approfondir le rôle potentiel du Rc A3 dans le développement des progéniteurs dopaminergiques du MV et également dans la pathogenèse de la LND.

2. Perspectives et ouverture du test de criblage à haut débit

2.1. Criblage à haut débit de composés à potentiel thérapeutique et modélisation

Ce test pourrait servir au criblage de plus larges banques de composés ciblant le SNC. Cela pourrait servir à continuer d'optimiser le protocole mais également à identifier des molécules à potentiel thérapeutique pour des maladies impliquant le développement des progéniteurs et des neurones dopaminergiques ou sérotoninergiques par exemple, comme ces deux populations sont retrouvées lors de la différenciation. Il est également possible de reprogrammer des cellules somatiques de patients MLN (Sutcliffe et al., 2021), et dans un cas, d'une femme porteuse saine de la mutation (Park et al., 2008) et de les redifférencier en neurones DA et leur cellules progénitrices (Bell et al., 2021) ou en hNSC (Dinasarapu et al., 2022; Ruillier et al., 2020). Il est alors possible d'explorer *in vitro* les mécanismes de la maladie dans les cellules neurales humaines naturellement déficientes en HGPRT jusqu'à présent difficilement accessibles. Les cellules neurales obtenues à partir de CSPh pourraient alors servir à la recherche de nouvelles thérapies, comme c'est le cas dans le papier de Ruillier et al., 2020 ; où le criblage à haut débit de molécules à potentiel thérapeutique sur des NSC corticales dérivées de lignées hiPSC MLN et hESC KO *HPRT1* a permis d'identifier plusieurs molécules capables de corriger le phénotype neuronal.

La technologie des hiPSC de patients avec des profils génétiques connus a déjà permis la modélisation *in vitro* et/ou la réalisation de criblages à haut débit dans le cadre de pathologies neuropsychiatriques, neurodéveloppementales ou neurodégénératives (Benchoua et al., 2021). C'est le cas des pathologies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson ou d'Alzheimer (C. Y. Chung et al., 2013; Kondo et al., 2013; Little et al., 2018; Lo Giudice et al., 2019; van der Kant et al., 2019; C. Wang et al., 2017, 2018; Yamaguchi et al., 2020), des pathologies neurodéveloppementales rares comme le syndrome de l'X fragile (Kaufmann et al., 2015; Kumari et al., 2015) ou encore des TSA associés à une duplication d'un segment du chromosome 7 ou des mutations du gène SHANK3 (Cavallo et al., 2020; Darville et al., 2016; Shcheglovitov et al., 2013).

2.2. Optimisation et standardisation de protocole dans l'objectif de greffe

En poussant plus loin les perspectives, comme énoncé dans l'introduction, de nombreux efforts sont fournis depuis plusieurs décennies par des équipes de recherche ou des industriels pour développer des protocoles ou des kits de différenciation permettant la dérivation de progéniteurs du MV compétents pour la différenciation en nDA, l'intégration et la survie en cas de greffe chez des modèles animaux (Brot et al., 2022; Doi et al., 2014; Grealish et al., 2014; Kirkeby et al., 2012; Kriks et al., 2011; Marton & Ioannidis, 2019; Nolbrant et al., 2017). Le 13 février 2023, l'équipe de l'essai clinique STEM-PD à d'ailleurs annoncé la première greffe chez un patient atteint de la maladie de Parkinson basée sur la technologie des cellules souches (Source : https://www.lunduniversity.lu.se/article/first-patient-receives-milestone-stem-cell-based-transplant-parkinsons-disease).

Un tel test de criblage pourrait servir au criblage de cytokines, morphogènes ou de conditions de cultures différentes pour optimiser la standardisation, la reproductibilité ainsi que le rendement de la différenciation des CSPh en progéniteurs dopaminergiques dans le cadre de la thérapie cellulaire pour la maladie de Parkinson.

2.3. Identification de voies de signalisation impliquées dans la mise en place de maladies neuropsychiatriques impliquant les neurones DA

Dans l'introduction, il a été évoqué les modèles cellulaires *in vitro* dérivés de cellules tumorales utilisés pour modéliser le déficit en enzyme HGPRT pour la MLN. Ces modèles, de part leur nature, sont peu représentatifs du développement neuronal physiologique et des altérations des neurones DA survenant au cours de celui-ci. Les cellules de patients atteints de la MLN sont des modèles privilégiés pour étudier les perturbations du métabolisme. Dans leur publication, Cristini et al., 2010 ont étudié les conséquences du déficit en HGPRT sur la différenciation de neurones à partir de cellules souches neurales humaines (hNSC) isolées de cerveaux de fœtus humains MLN. Ils ont pu mettre en évidence des aberrations au niveau de l'expression de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation neuronale et des marqueurs de gènes impliqués dans la synthèse de la DA suggérant un rôle dans le développement neuronal de l'HGPRT. Leurs résultats mettent en évidence une altération de la neurogenèse dans la pathologie et appuient l'importance d'un modèle de développement humain et neuronal, comme les hNSC, pour étudier les mécanismes de la maladie et pour la

recherche de futures thérapies.

En 2004, Urbach, Schuldiner et Benvenisty ont développé un modèle d'étude de la maladie de Lesch-Nyhan en induisant la mutation du gène *HPRT1* dans des cellules souches embryonnaires humaines par recombinaison homologue. Après sélection des cellules *HPRT1*- en ajoutant au milieu de la 6-TG, ils ont pu observer une augmentation d'acide urique dans les cellules *HPRT1*- par rapport aux contrôles non mutés, et ce, avec et sans activation de la voie de dégradation par ajout d'hypoxanthine (Urbach et al., 2004). Des modèles déficients pour l'HGPRT peuvent également être générés à partir de cellules souches pluripotentes humaines en utilisant des shRNA afin d'aller réduire l'expression du gène (Mastrangelo et al., 2012). Ajoutés aux modèles hESC, les modèles dérivés d'hiPSC offrent la possibilité de modéliser la MLN de façon à représenter la variabilité génotypique et phénotypique présente dans la population atteinte de la pathologie (Bell et al., 2021; Dinasarapu et al., 2022; Ruillier et al., 2020; Sutcliffe et al., 2021).

Les protocoles de différenciation des nDA et leur cellules progénitrices *in vitro* décrits dans l'introduction, sont en 2D. Plus récemment, des modèles cellulaires en 3D ont été développés en se basant sur la capacité des CSPh ou de cellules souches adultes à s'organiser et former des agrégats. Ces structures en 3D qui permettent de modéliser de manière plus physiologique le développement d'organes particuliers et les pathologies les concernant sont appelées : organoïdes. Il existe aujourd'hui différents types d'organoïdes en développement en recherche, tels que des organoïdes cérébraux, de la rétine, de l'intestin, du foie, de rein (Clevers, 2016).

Pour la modélisation de pathologies neurodéveloppementales et des neurones DA : comme pour les modèles 2D, les hESC et par extension les hiPSC sont capables de se polariser et de s'auto-organiser vers un tissu particulier sous l'influence de cytokines et de former une structure contenant un neuroépithélium ainsi que différents types de domaines cérébraux (Eiraku et al., 2008; Eiraku & Sasai, 2012). Cette technologie a été utilisé pour le développement d'organoïdes cérébraux capables de mimer le développement embryonnaire des différentes structures comme le cortex, le télencéphale ventral, des cellules rétiniennes ou encore le plexus choroïde (Lancaster & Knoblich, 2014). Ils permettent de modéliser une diversité cellulaire similaire à celle observée au cours de la différenciation cérébrale (Arlotta & Paşca, 2019;

Velasco et al., 2019). Grâce à cette technologie il est possible de développer comme pour les modèles 2D à partir de CSPh des modèles d'études de pathologies neuronales comme la microcéphalie ou la maladie de Parkinson (Lancaster et al., 2013; Marton & Paşca, 2020). Des protocoles pour développer des organoïdes du mésencéphale ont été développés (Jo et al., 2016; Nickels et al., 2020) et l'analyse en single-cell RNAseq de ces structures a permis d'observer une diversité au sein des populations dopaminergiques semblable à celle retrouvée dans le cerveau (Fiorenzano et al., 2021).

Pour modéliser les progéniteurs dopaminergiques du MV à partir des CSPh il existe donc plusieurs protocoles. Les modélisations en 2D et 3D sont pour l'instant complémentaires. Bien que les protocoles en 2D soient moins représentatifs du développement physiologique que les modèles 3D et ne soient pas entièrement spécifiques ils restent pour le moment les mieux adaptés au criblage à haut débit en termes de coût et de réalisation. Il y a donc un intérêt réel à les optimiser pour le criblage à haut débit de molécules thérapeutiques pour les pathologies affectant ces neurones.

Pour mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de la MLN, ces deux approches 2D et 3D pourraient être utilisées de façon complémentaire. En effet, l'étude d'organoïdes avec un profil mésencéphalique dérivés à partir avec des CSPh de patients MLN pourraient permettre d'observer un phénotype éventuel visible en 3D pour la mise en place des nDA et des différentes populations qui émergent au cours de la mise du MV. Les composés identifiés lors des criblages pour l'optimisation ou leur potentiel thérapeutique pourraient ensuite être testés sur ces modèles pour confirmer ou non leur effet sur le phénotype de la maladie.

Le test de criblage à haut débit décrit dans cette thèse pourrait, en plus de la MLN, servir à la modélisation et au criblage de composés dans d'autres modèles de pathologies affectant les nDA. De plus, comme ici avec les voies des purines, il pourrait permettre de cribler des molécules ciblant les voies connues dans la pathologie d'intérêt. Il pourrait également permettre via cette approche d'explorer plus en profondeur les mécanismes de développement des nDA et les voies de signalisation impliquées.

CONCLUSION GENERALE

Nous disposons d'un protocole de différenciation nous permettant d'obtenir en vingt-cinq jours des progéniteurs dopaminergiques du mésencéphale ventral compétents pour la différenciation en nDA matures. Durant ma thèse j'ai pu amener ce protocole vers un format miniaturisé adapté pour le criblage à haut débit. Pour mes travaux, j'ai réalisé un criblage des molécules purinergiques et adénosinergiques. Le choix de la banque a été déterminé par le fait que le déficit en HGPRT dans la maladie de Lesch-Nyhan semble être associé à une altération du développement des nDA. Le criblage primaire et les validations en DR m'ont permis de sélectionner un composé potentiel pour moduler la genèse des progéniteurs des nDA du MV et donc des nDA en augmentant le pourcentage des cellules positives pour les marqueurs du MV : EN-1 et FOXA2. De façon intéressante, cette molécule nous permet d'augmenter le pourcentage de progéniteurs EN-1+/FOXA2+ et des nDA dans des lignées de CSPh contrôles mais également dans une lignée modèle de la maladie de Lesch-Nyhan en permettant de restaurer le taux de progéniteurs EN-1+/FOXA2+ par rapport aux contrôles. Le composé potentiel, le C08, est un agoniste du récepteur à l'adénosine ADORA3 dont le rôle dans la mise en place des nDA au cours du développement est encore peu connu. L'étude des mécanismes d'action de ce composé nous permettrait par la suite d'explorer son implication dans la mise en place des populations neuronales dopaminergiques du MV, mais également de la MHB. En effet, grâce à ce protocole nous obtenons également d'autres types de progéniteurs comme des neurones sérotoninergiques, qui émergent du cerveau postérieur en arrière de la MHB au cours du développement. De plus, cela nous permettrait également d'approfondir les hypothèses sur les défauts de la mise en place des nDA au cours du développement dans la maladie de Lesch-Nyhan. Enfin, le travail d'optimisation de la différenciation des nDA pourrait également servir à améliorer la confirmation de l'effet des molécules en permettant une meilleure différenciation de ces neurones et de leur identification.

Les expériences réalisées lors des travaux de thèse ont permis de faire la preuve de concept d'un test de criblage à haut débit pour l'identification de molécules permettant de moduler la genèse des nDA. Ce test pourrait être adapté pour le criblage de molécules dans un but d'optimisation de protocole de genèse des nDA mais également dans le cadre de criblage thérapeutique pour des pathologies affectant ces neurones.

ANNEXES

Screen-Well® Neurotransmitter Library (Purinergic and Adenosine Ligands)
BML-2820 Version 4.4

N° composé	ADENOSINES							
	Plate Location	Cat. No.	CAS #	Drug Name	M.W.	Solvent	Conc.	Activity
1	B1	AC-589	58-61-7	Adenosine	267,2	DMSO	10 mM	Endogenous agonist
2	B2	AC-590	96760-69-9	Adenosine amine congener	576,6	DMSO	10 mM	A1 adenosine agonist
3	B3	AC-594	146-77-0	2-Chloroadenosine	301,7	WATER	10 mM	A1 adenosine agonist
4	B4	AC-601	78647-50-4	5'-N-Ethylcarboxamidoadenosine	308,3	DMSO	10 mM	A1/A2 adenosine agonist
5	B5	AC-961	50908-62-8	5'-(N-Cyclopropyl)carboximidoadenosine	320,3	DMSO	10 mM	A2 adenosine agonist
6	B6	AC-776	35788-27-3	5'-N-Methylcarboxamidoadenosine		DMSO	10 mM	A2 adenosine agonist
7	B7	AC-581	163042-96-4	1-[2-Chloro-6-[[(3-iodophenyl)methyl]amino]-9H-purin-9-yl]-1-deoxy-N-methyl-β-D-ribofuranuronamide	544,7	DMSO	10 mM	A3 adenosine agonist
8	B8	AC-582	152918-18-8	1-Deoxy-1-[6-[[(3-iodophenyl)methyl]amino]-9H-purin-9-yl]-N-methyl-β-D-ribofuranuronamide	510,3	DMSO	10 mM	A3 adenosine agonist
9	B9	AC-588	152918-26-8	N6-(4-Aminobenzyl)-N-methylcarboxamidoadenosine	399,4	DMSO	10 mM	A3 adenosine agonist
10	B10	AC-1308	89705-21-5	N6-2-(4-Aminophenyl)ethyladenosine	386,4	DMSO	10 mM	
11	B11	AC-585	183721-15-5	MRS 1220	403,8	DMSO	10 mM	A3 adenosine antagonist
12	B12	AC-586	139180-30-6	ZM 241385	337,3	DMSO	10 mM	A2A adenosine antagonist
13	C1	AC-772	35873-49-5	8-Cyclopentyltheophylline	248,3	DMSO	10 mM	A1 adenosine antagonist
14	C2	AC-773	36396-99-3	N6-Cyclohexyladenosine	349,4	DMSO	10 mM	A1 adenosine agonist
15	C3	AC-774	41552-82-3	N6-Cyclopentyladenosine	335,4	DMSO	10 mM	A1 adenosine agonist
16	C4	AC-775	102146-07-6	8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine	304,4	DMSO	10 mM	A1 adenosine antagonist
17	C5	AC-778	58-55-9	Theophylline	180,2	DMSO	10 mM	A2B adenosine receptor ligand
18	C6	AC-627	519-37-9	7-(β-Hydroxyethyl)theophylline	224,2	DMSO	10 mM	Theophylline analog
19	C7	AC-636	80206-91-3	8-(p-Sulfophenyl)theophylline	336,3	DMSO	10 mM	Adenosine antagonist
20	C8	AC-615	317-34-0	Aminophylline	420,4	DMSO	10 mM	Theophylline analog
21	C9	AC-626	80288-49-9	Furafylline	260,2	DMSO	10 mM	Methylxanthine derivative
22	C10	AC-648	55242-55-2	Propentofylline	306,4	DMSO	10 mM	Adenosine transport inhibitor
23	C11	LP-102	6493-06--7	(±)-Lisofylline	280,3	DMSO	10 mM	
24	C12	AC-595	37739-05-2	2-Chloro-N6-cyclopentyladenosine	369,8	DMSO	10 mM	A1 adenosine agonist
25	D1	ALX-550-322	58-08-2	Caffeine	194,2	DMSO	10 mM	A1/A2A adenosine antagonist
26	D2	AC-609	38594-96-6	(-)-N6-(2-Phenylisopropyl)adenosine	385,4	DMSO	10 mM	A1 adenosine agonist
27	D3	AC-610	38594-97-7	(+)-N6-(2-Phenylisopropyl)adenosine	385,4	DMSO	10 mM	A1 adenosine agonist Less active isomer
28	D4	AC-611	143668-15-9	N6-P-Sulfophenyladenosine sodium salt	445,4	DMSO	10 mM	A1 adenosine agonist
29	D5	AC-612	490-59-5	Alloxazine	214,2	DMSO	10 mM	A2B adenosine antagonist
30	D6	AC-633	611-59-6	Paraxanthine	180,2	DMSO	10 mM	Adenosine receptor ligand
31	D7	AC-613	149981-23-7	1-Allyl-3,7-dimethyl-8-phenylxanthine	296,3	DMSO	10 mM	A1 adenosine antagonist
32	D8	AC-614	149981-25-9	1-Allyl-3,7-dimethyl-8-p-sulfophenylxanthine	376,4	DMSO	10 mM	A2 adenosine antagonist
33	D9	AC-623	31542-63-9	1,3-Dipropyl-7-methylxanthine	250,3	DMSO	10 mM	A2 adenosine receptor ligand
34	D10	AC-625	14114-46-6	3,7-Dimethyl-1-propargylxanthine	218,2	DMSO	10 mM	A2 adenosine antagonist
35	D11	AC-628	28822-58-4	3-Isobutyl-1-methylxanthine	222,2	DMSO	10 mM	Adenosine receptor antagonist
36	D12	AC-951	85872-53-3	1,3-Dipropyl-8-phenylxanthine	312,4	DMSO	10 mM	A1 adenosine antagonist
37	E1	AC-635	41078-02-8	3-n-Propylxanthine	194,2	DMSO	10 mM	A1/2 adenosine antagonist
38	E2	AC-617	104615-18-1	(9-Chloro-2-(2-furyl)(1,2,4)triazolo(1,5-C)quinazolin-5-amine)	285,7	DMSO	10 mM	Adenosine receptor antagonist
39	E3	AC-619	147700-11-6	8-(3-Chlorostyryl)caffeine	330,8	DMSO	10 mM	A2A adenosine antagonist
	E4			Blank				
40	E5	AC-640	20153-98-4	Dilazep·HCl	677,6	DMSO	10 mM	Adenosine uptake inhibitor
41	E6	PD-129	51350-19-7	(±)-Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine·HCl	313,8	DMSO	10 mM	Adenosine deaminase inhibitor
42	E7	EI-293	24386-93-4	5-Iodotubericidin	392,1	DMSO	10 mM	Adenosine kinase inhibitor
43	E8	AD-101	38048-32-7	S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioinosine	419,4	DMSO	10 mM	Adenosine uptake inhibitor
44	E9	AC-646	13153-27-0	S-(4-Nitrobenzyl)-6-thioguanosine	434,4	DMSO	10 mM	Adenosine transport inhibitor
45	E10	AD-100	102146-07-6	PD 116,948	304,4	DMSO	10 mM	A1 adenosine antagonist
46	E11	EI-127	58-32-2	Dipydridamole	504,6	DMSO	10 mM	Adenosine transport inhibitor
47	E12	AC-988	15763-06-1	1-Methyladenosine	281,3	DMSO	10 mM	Adenosine analog
48	F1	AC-989	1867-73-8	N6-Methyladenosine	281,3	DMSO	10 mM	Adenosine analog
49	F2	AC-990	2002-35-9	N6-Methyl-2'-deoxyadenosine	265,3	DMSO	10 mM	Adenosine analog
50	F3	AC-991	979-92-0	S-Adenosyl-L-homocysteine	384,4	DMSO	10 mM	Adenosine conjugate
51	F4	AC-992	6736-58-9	3-Deazaadenosine	266,3	DMSO	10 mM	Adenosine analog

Tableau S1 : Caractéristiques des ligands adénosinergiques (composés 1 à 51) de la banque Screen-Well® Neurotransmitter Library (Purinergic and Adenosine Ligands) de chez Enzo Life Sciences.

Screen-Well® Neurotransmitter Library (Purinergic and Adenosine Ligands)
BML-2820 Version 4.4

N° composé	PURINES							
	Plate Location	Cat. No.	CAS #	Drug Name	M.W.	Solvent	Conc.	Activity
52	F5	AC-953	51963-61-2	ATP disodium salt	551,1	WATER	10 mM	Endogenous P2Y agonist
53	F6	AC-944	43170-89-4	2-Methylthioadenosine triphosphate	641,2	WATER	10 mM	P2Y agonist
54	F7	AC-1290	135046-48-9	Clopidogrel sulfate	419,9	DMSO	10 mM	P2Y12 inhibitor
55	F8	AC-946	104869-31-0	NF 023	1162,9	WATER	10 mM	P2X antagonist
56	F9	AC-947	202983-32-2	NF 279	1401,1	DMSO	10 mM	P2X1 antagonist
57	F10	AC-948	149017-66-3	Pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid·4Na	599,3	WATER	10 mM	P2X antagonist
58	F11	AC-950	1021868-77-8	Pyridoxal-5'-phosphate-6-(2'-naphthylazo-6'-nitro-4',8'-disulfonate)·4Na (PPNDS)	693,9	DMSO	10 mM	P2X1 antagonist
59	F12	AC-954	102783-36-8	P1,P4-DI(adenosine-5')tetraphosphate ammonium salt	836,4	DMSO	10 mM	Purinergic receptor ligand
60	G1	AC-955	104809-20-3	α,β-Methyleneadenosine 5'-triphosphate	505,2	WATER	10 mM	P2X agonist
61	G2	AC-956	7414-56-4	β,γ-Methyleneadenosine 5'-triphosphate·2Na	549,2	WATER	10 mM	P2X agonist
62	G3	G-430	129-46-4	Suramin·6Na	1429,2	DMSO	10 mM	P2Y antagonist
63	G4	AC-1002	149022-20-8	Adenosine-5'-monophosphate (AMP)	347,2	DMSO	10 mM	ATP metabolite
64	G5	AC-995	81921-35-9	N6-Methyladenosine-5'-monophosphate·Na	383,2	WATER	10 mM	AMP analog
65	G6	AC-996	68414-18-6	Adenosine-5'-diphosphoribose	559,3	DMSO	10 mM	Endogenous P2Y agonist
66	G7	AC-997	20398-34-9	Adenosine-5'-diphosphate (ADP)	427,2	WATER	10 mM	Endogenous P2Y agonist
67	G8	AC-998	19817-92-6	Uridine-5'-triphosphate·3Na	550,1	WATER	10 mM	P2Y4 agonist
68	G9	AC-999	21931-53-3	Uridine-5'-diphosphate	404,2	WATER	10 mM	P2Y6 agonist
69	G10	AC-1000	3387-36-8	Uridine-5'-monophosphate	368,1	WATER	10 mM	UTP metabolite
70	G11	AC-1001	104835-70-3	α,β-Methyleneadenosine-5'-diphosphate·Na	425,2	DMSO	10 mM	ADP agonist
71	G12	AC-993	53885-35-1	Ticlopidine·HCl	300,2	DMSO	10 mM	P2Y12 receptor ligand
72	H1	AC-1003	36051-31-7	Guanosine-5'-triphosphate·Na	523,2	WATER	10 mM	Endogenous agonist
73	H2	AC-1004	43139-22-6	Guanosine-5'-diphosphate	443,2	WATER	10 mM	Endogenous agonist

Tableau S2 : Caractéristiques des ligands purinergiques (composés 52 à 73) de la banque Screen-Well® Neurotransmitter Library (Purinergic and Adenosine Ligands) de chez Enzo Life Sciences.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbracchio, M. P., & Cattabeni, F. (1999). Brain adenosine receptors as targets for therapeutic intervention in neurodegenerative diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *890*, 79-92. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb07983.x

Abel, T. J., Dalm, B. D., Grossbach, A. J., Jackson, A. W., Thomsen, T., & Greenlee, J. D. W. (2014). Lateralized effect of pallidal stimulation on self-mutilation in Lesch-Nyhan disease : Case report. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics*, *14*(6), 594-597. https://doi.org/10.3171/2014.8.PEDS1451

Adler, A. F., Cardoso, T., Nolbrant, S., Mattsson, B., Hoban, D. B., Jarl, U., Wahlestedt, J. N., Grealish, S., Björklund, A., & Parmar, M. (2019). HESC-Derived Dopaminergic Transplants Integrate into Basal Ganglia Circuitry in a Preclinical Model of Parkinson's Disease. *Cell Reports*, *28*(13), 3462-3473.e5. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.058

Akamatsu, W., Fujihara, H., Mitsuhashi, T., Yano, M., Shibata, S., Hayakawa, Y., Okano, H. J., Sakakibara, S., Takano, H., Takano, T., Takahashi, T., Noda, T., & Okano, H. (2005). The RNA-binding protein HuD regulates neuronal cell identity and maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(12), 4625-4630. https://doi.org/10.1073/pnas.0407523102

Allen, S. M., & Rice, S. N. (1996). Risperidone antagonism of self-mutilation in a Lesch-Nyhan patient. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *20*(5), 793-800. https://doi.org/10.1016/0278-5846(96)00059-0

Alves dos Santos, M. T. M., & Smidt, M. P. (2011). En1 and Wnt signaling in midbrain dopaminergic neuronal development. *Neural Development*, *6*, 23. https://doi.org/10.1186/1749-8104-6-23

Amit, M., & Itskovitz-Eldor, J. (2006). Maintenance of human embryonic stem cells in animal serum- and feeder layer-free culture conditions. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *331*, 105-113. https://doi.org/10.1385/1-59745-046-4:105

Andersson, E., Jensen, J. B., Parmar, M., Guillemot, F., & Björklund, A. (2006). Development of the mesencephalic dopaminergic neuron system is compromised in the absence of neurogenin 2. *Development*, *133*(3), 507-516. https://doi.org/10.1242/dev.02224

Andersson, E. R., Prakash, N., Cajanek, L., Minina, E., Bryja, V., Bryjova, L., Yamaguchi, T. P., Hall, A. C., Wurst, W., & Arenas, E. (2008). Wnt5a Regulates Ventral Midbrain Morphogenesis and the Development of A9–A10 Dopaminergic Cells In Vivo. *PLoS ONE*, *3*(10), e3517. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003517

Andersson, E. R., Saltó, C., Villaescusa, J. C., Cajanek, L., Yang, S., Bryjova, L., Nagy, I. I., Vainio, S. J., Ramirez, C., Bryja, V., & Arenas, E. (2013). Wnt5a cooperates with canonical Wnts to generate midbrain dopaminergic neurons in vivo and in stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(7), E602-610. https://doi.org/10.1073/pnas.1208524110

Andersson, E., Tryggvason, U., Deng, Q., Friling, S., Alekseenko, Z., Robert, B., Perlmann, T., & Ericson, J. (2006). Identification of Intrinsic Determinants of Midbrain Dopamine Neurons. *Cell*, *124*(2), 393-405. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.037

Areal, L. B., & Blakely, R. D. (2020). Neurobehavioral changes arising from early life dopamine signaling perturbations. *Neurochemistry International*, *137*, 104747. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104747

Arenas, E., Denham, M., & Villaescusa, J. C. (2015). How to make a midbrain dopaminergic neuron. *Development*, *142*(11), 1918-1936. https://doi.org/10.1242/dev.097394

Arlotta, P., & Paşca, S. P. (2019). Cell diversity in the human cerebral cortex : From the embryo to brain

organoids. *Current Opinion in Neurobiology*, *56*, 194-198. https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.03.001

Asanuma, K., Ma, Y., Okulski, J., Dhawan, V., Chaly, T., Carbon, M., Bressman, S. B., & Eidelberg, D. (2005). Decreased striatal D2 receptor binding in non-manifesting carriers of the DYT1 dystonia mutation. *Neurology*, *64*(2), 347-349. https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000149764.34953.BF

Ashok, A. H., Marques, T. R., Jauhar, S., Nour, M. M., Goodwin, G. M., Young, A. H., & Howes, O. D. (2017). The dopamine hypothesis of bipolar affective disorder: The state of the art and implications for treatment. *Molecular Psychiatry*, *22*(5), 666-679. https://doi.org/10.1038/mp.2017.16

Assou, S., Bouckenheimer, J., & De Vos, J. (2018). Concise Review: Assessing the Genome Integrity of Human Induced Pluripotent Stem Cells: What Quality Control Metrics? *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *36*(6), 814-821. https://doi.org/10.1002/stem.2797

Avery, S., Hirst, A. J., Baker, D., Lim, C. Y., Alagaratnam, S., Skotheim, R. I., Lothe, R. A., Pera, M. F., Colman, A., Robson, P., Andrews, P. W., & Knowles, B. B. (2013). BCL-XL Mediates the Strong Selective Advantage of a 20q11.21 Amplification Commonly Found in Human Embryonic Stem Cell Cultures. *Stem Cell Reports*, *1*(5), 379-386. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.10.005

Baik, J.-H. (2013). Dopamine Signaling in reward-related behaviors. *Frontiers in Neural Circuits*, *7*. https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00152

Balestrino, R., & Schapira, A. h. v. (2020). Parkinson disease. *European Journal of Neurology*, *27*(1), 27-42. https://doi.org/10.1111/ene.14108

Balint, B., Mencacci, N. E., Valente, E. M., Pisani, A., Rothwell, J., Jankovic, J., Vidailhet, M., & Bhatia, K. P. (2018). Dystonia. *Nature Reviews. Disease Primers*, *4*(1), 25. https://doi.org/10.1038/s41572-018-0023-6

Barker, R. A., Parmar, M., Studer, L., & Takahashi, J. (2017). Human Trials of Stem Cell-Derived Dopamine Neurons for Parkinson's Disease: Dawn of a New Era. *Cell Stem Cell*, *21*(5), 569-573. https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.09.014

Barth, K. A., Kishimoto, Y., Rohr, K. B., Seydler, C., Schulte-Merker, S., & Wilson, S. W. (1999). Bmp activity establishes a gradient of positional information throughout the entire neural plate. *Development*, *126*(22), 4977-4987. https://doi.org/10.1242/dev.126.22.4977

Bartoli, F., Burnstock, G., Crocamo, C., & Carrà, G. (2020). Purinergic Signaling and Related Biomarkers in Depression. *Brain Sciences*, *10*(3), 160. https://doi.org/10.3390/brainsci10030160

Bar-Yehuda, S., Silverman, M. H., Kerns, W. D., Ochaion, A., Cohen, S., & Fishman, P. (2007). The anti-inflammatory effect of A3 adenosine receptor agonists: A novel targeted therapy for rheumatoid arthritis. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, *16*(10), 1601-1613. https://doi.org/10.1517/13543784.16.10.1601

Beaulieu, J.-M., & Gainetdinov, R. R. (2011). The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacological Reviews*, *63*(1), 182-217. https://doi.org/10.1124/pr.110.002642

Beers, J., Gulbranson, D. R., George, N., Siniscalchi, L. I., Jones, J., Thomson, J. A., & Chen, G. (2012). Passaging and colony expansion of human pluripotent stem cells by enzyme-free dissociation in chemically defined culture conditions. *Nature Protocols*, *7*(11), 2029-2040. https://doi.org/10.1038/nprot.2012.130

Bell, S., Kolobova, I., Crapper, L., & Ernst, C. (2016). Lesch-Nyhan Syndrome: Models, Theories, and Therapies. *Molecular Syndromology*, *7*(6), 302-311. https://doi.org/10.1159/000449296

Bell, S., McCarty, V., Peng, H., Jefri, M., Hettige, N., Antonyan, L., Crapper, L., O'Leary, L. A., Zhang, X., Zhang, Y., Wu, H., Sutcliffe, D., Kolobova, I., Rosenberger, T. A., Moquin, L., Gratton, A., Popic, J., Gantois, I., Stumpf, P. S., … Ernst, C. (2021). Lesch-Nyhan disease causes impaired energy

metabolism and reduced developmental potential in midbrain dopaminergic cells. *Stem Cell Reports*, *16*(7), 1749-1762. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.06.003

Ben M'Barek, K., Regent, F., & Monville, C. (2015). Use of human pluripotent stem cells to study and treat retinopathies. *World Journal of Stem Cells*, *7*(3), 596-604. https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i3.596

Benchoua, A., Lasbareilles, M., & Tournois, J. (2021). Contribution of Human Pluripotent Stem Cell-Based Models to Drug Discovery for Neurological Disorders. *Cells*, *10*(12), 3290. https://doi.org/10.3390/cells10123290

Ben-David, U., & Benvenisty, N. (2011). The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nature Reviews Cancer*, *11*(4), 268-277. https://doi.org/10.1038/nrc3034

Benke, P. J., Herrick, N., Smitten, L., Aradine, C., Laessig, R., & Wolcott, G. J. (1973). Adenine and Folic Acid in the Lesch-Nyhan Syndrome. *Pediatric Research*, *7*(9), 729-738. https://doi.org/10.1203/00006450-197309000-00001

Bergman, O., Håkansson, A., Westberg, L., Nordenström, K., Carmine Belin, A., Sydow, O., Olson, L., Holmberg, B., Eriksson, E., & Nissbrandt, H. (2010). PITX3 polymorphism is associated with early onset Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, *31*(1), 114-117. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.03.008

Bertelli, M., Alushi, B., Veicsteinas, A., Jinnah, H. A., & Micheli, V. (2009). Gene expression and mRNA editing of serotonin receptor 2C in brains of HPRT gene knock-out mice, an animal model of Lesch-Nyhan disease. *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, *16*(8), 1061-1063. https://doi.org/10.1016/j.jocn.2008.12.011

Bertelli, M., Cecchin, S., Lapucci, C., Jacomelli, G., Jinnah, H. A., Pandolfo, M., & Micheli, V. (2006). Study of the adenosinergic system in the brain of HPRT knockout mouse (Lesch-Nyhan disease). *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, *373*(1-2), 104-107. https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.05.013

Bitler, C. M., & Howard, B. D. (1986). Dopamine metabolism in hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase-deficient variants of PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*, *47*(1), 107-112. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1986.tb02837.x

Björklund, A., & Dunnett, S. B. (2007). Dopamine neuron systems in the brain: An update. *Trends in Neurosciences*, *30*(5), 194-202. https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.03.006

Blaess, S., & Ang, S.-L. (2015). Genetic control of midbrain dopaminergic neuron development: Dopaminergic neuron development. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, *4*(2), 113-134. https://doi.org/10.1002/wdev.169

Blaess, S., Bodea, G. O., Kabanova, A., Chanet, S., Mugniery, E., Derouiche, A., Stephen, D., & Joyner, A. L. (2011). Temporal-spatial changes in Sonic Hedgehog expression and signaling reveal different potentials of ventral mesencephalic progenitors to populate distinct ventral midbrain nuclei. *Neural Development*, *6*, 29. https://doi.org/10.1186/1749-8104-6-29

Bodea, G. O., & Blaess, S. (2015). Establishing diversity in the dopaminergic system. *FEBS Letters*, *589*(24PartA), 3773-3785. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.09.016

Boissart, C., Poulet, A., Georges, P., Darville, H., Julita, E., Delorme, R., Bourgeron, T., Peschanski, M., & Benchoua, A. (2013). Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening. *Translational Psychiatry*, *3*(8), e294-e294. https://doi.org/10.1038/tp.2013.71

Borea, P. A., Gessi, S., Merighi, S., Vincenzi, F., & Varani, K. (2018). Pharmacology of Adenosine Receptors: The State of the Art. *Physiological Reviews*, *98*(3), 1591-1625. https://doi.org/10.1152/physrev.00049.2017

Borea, P. A., Varani, K., Vincenzi, F., Baraldi, P. G., Tabrizi, M. A., Merighi, S., & Gessi, S. (2015). The A_3 Adenosine Receptor: History and Perspectives. *Pharmacological Reviews*, *67*(1), 74-102. https://doi.org/10.1124/pr.113.008540

Bostan, A. C., & Strick, P. L. (2018). The basal ganglia and the cerebellum: Nodes in an integrated network. *Nature Reviews. Neuroscience*, *19*(6), 338-350. https://doi.org/10.1038/s41583-018-0002-7

Bozdemir, E., Vigil, F. A., Chun, S. H., Espinoza, L., Bugay, V., Khoury, S. M., Holstein, D. M., Stoja, A., Lozano, D., Tunca, C., Sprague, S. M., Cavazos, J. E., Brenner, R., Liston, T. E., Shapiro, M. S., & Lechleiter, J. D. (2021). Neuroprotective Roles of the Adenosine A3 Receptor Agonist AST-004 in Mouse Model of Traumatic Brain Injury. *Neurotherapeutics*, *18*(4), 2707-2721. https://doi.org/10.1007/s13311-021-01113-7

Braam, S. R., Zeinstra, L., Litjens, S., Ward-van Oostwaard, D., van den Brink, S., van Laake, L., Lebrin, F., Kats, P., Hochstenbach, R., Passier, R., Sonnenberg, A., & Mummery, C. L. (2008). Recombinant vitronectin is a functionally defined substrate that supports human embryonic stem cell self-renewal via alphavbeta5 integrin. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *26*(9), 2257-2265. https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0291

Bradley, R. A., Shireman, J., McFalls, C., Choi, J., Canfield, S. G., Dong, Y., Liu, K., Lisota, B., Jones, J. R., Petersen, A., Bhattacharyya, A., Palecek, S. P., Shusta, E. V., Kendziorski, C., & Zhang, S.-C. (2019). Regionally specified human pluripotent stem cell-derived astrocytes exhibit different molecular signatures and functional properties. *Development (Cambridge, England)*, *146*(13), dev170910. https://doi.org/10.1242/dev.170910

Breese, G. R., Baumeister, A. A., McCown, T. J., Emerick, S. G., Frye, G. D., & Mueller, R. A. (1984). Neonatal-6-hydroxydopamine treatment: Model of susceptibility for self-mutilation in the Lesch-Nyhan syndrome. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *21*(3), 459-461. https://doi.org/10.1016/s0091-3057(84)80110-0

Breese, G. R., Knapp, D. J., Criswell, H. E., Moy, S. S., Papadeas, S. T., & Blake, B. L. (2005). The neonate-6-hydroxydopamine-lesioned rat: A model for clinical neuroscience and neurobiological principles. *Brain Research. Brain Research Reviews*, *48*(1), 57-73. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.08.004

Broccoli, V., Boncinelli, E., & Wurst, W. (1999). The caudal limit of Otx2 expression positions the isthmic organizer. *Nature*, *401*(6749), 164-168. https://doi.org/10.1038/43670

Brodski, C., Blaess, S., Partanen, J., & Prakash, N. (2019). Crosstalk of Intercellular Signaling Pathways in the Generation of Midbrain Dopaminergic Neurons In Vivo and from Stem Cells. *Journal of Developmental Biology*, *7*(1), 3. https://doi.org/10.3390/jdb7010003

Brodski, C., Weisenhorn, D. M. V., Signore, M., Sillaber, I., Oesterheld, M., Broccoli, V., Acampora, D., Simeone, A., & Wurst, W. (2003). Location and size of dopaminergic and serotonergic cell populations are controlled by the position of the midbrain-hindbrain organizer. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *23*(10), 4199-4207. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-10-04199.2003

Brot, S., Thamrin, N. P., Bonnet, M.-L., Francheteau, M., Patrigeon, M., Belnoue, L., & Gaillard, A. (2022). Long-Term Evaluation of Intranigral Transplantation of Human iPSC-Derived Dopamine Neurons in a Parkinson's Disease Mouse Model. *Cells*, *11*(10), 1596. https://doi.org/10.3390/cells11101596

Brüggemann, N. (2021). Contemporary functional neuroanatomy and pathophysiology of dystonia. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, *128*(4), 499-508. https://doi.org/10.1007/s00702-021-02299-y

Burnstock, G. (2016). An introduction to the roles of purinergic signalling in neurodegeneration, neuroprotection and neuroregeneration. *Neuropharmacology*, *104*, 4-17. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.05.031

Burnstock, G. (2018). Purine and purinergic receptors. *Brain and Neuroscience Advances*, *2*, 2398212818817494. https://doi.org/10.1177/2398212818817494

Burnstock, G. (2020). Introduction to Purinergic Signaling. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *2041*, 1-15. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9717-6_1

Burnstock, G., Krügel, U., Abbracchio, M. P., & Illes, P. (2011). Purinergic signalling: From normal behaviour to pathological brain function. *Progress in Neurobiology*, *95*(2), 229-274. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.08.006

Campbell, N. G., Zhu, C.-B., Lindler, K. M., Yaspan, B. L., Kistner-Griffin, E., NIH ARRA Consortium, Hewlett, W. A., Tate, C. G., Blakely, R. D., & Sutcliffe, J. S. (2013). Rare coding variants of the adenosine A3 receptor are increased in autism: On the trail of the serotonin transporter regulome. *Molecular Autism*, *4*(1), 28. https://doi.org/10.1186/2040-2392-4-28

Canals, I., Ginisty, A., Quist, E., Timmerman, R., Fritze, J., Miskinyte, G., Monni, E., Hansen, M. G., Hidalgo, I., Bryder, D., Bengzon, J., & Ahlenius, H. (2018). Rapid and efficient induction of functional astrocytes from human pluripotent stem cells. *Nature Methods*, *15*(9), 693-696. https://doi.org/10.1038/s41592-018-0103-2

Carlsson, A., Dahlstroem, A., Fuxe, K., & Lindqvist, M. (1965). HISTOCHEMICAL AND BIOCHEMICAL DETECTION OF MONOAMINE RELEASE FROM BRAIN NEURONS. *Life Sciences (1962)*, *4*, 809-816. https://doi.org/10.1016/0024-3205(65)90313-9

Carlsson, A., Falck, B., & Hillarp, N. A. (1962). Cellular localization of brain monoamines. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*, *56*(196), 1-28.

Carlsson, A., Lindqvist, M., Magnusson, T., & Waldeck, B. (1958). On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science (New York, N.Y.)*, *127*(3296), 471. https://doi.org/10.1126/science.127.3296.471

Caruso, I., Fumagalli, M., Boccassini, L., Sarzi Puttini, P., Ciniselli, G., & Cavallari, G. (1984). Antidepressant activity of S-adenosylmethionine. *Lancet (London, England)*, *1*(8382), 904. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(84)91360-6

Castells, S., Chakrabarti, C., Winsberg, B. G., Hurwic, M., Perel, J. M., & Nyhan, W. L. (1979). Effects of L-5-hydroxytryptophan on monoamine and amino acids turnover in the Lesch-Nyhan syndrome. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, *9*(1), 95-103. https://doi.org/10.1007/BF01531296

Cavallo, F., Troglio, F., Fagà, G., Fancelli, D., Shyti, R., Trattaro, S., Zanella, M., D'Agostino, G., Hughes, J. M., Cera, M. R., Pasi, M., Gabriele, M., Lazzarin, M., Mihailovich, M., Kooy, F., Rosa, A., Mercurio, C., Varasi, M., & Testa, G. (2020). High-throughput screening identifies histone deacetylase inhibitors that modulate GTF2I expression in 7q11.23 microduplication autism spectrum disorder patient-derived cortical neurons. *Molecular Autism*, *11*(1), 88. https://doi.org/10.1186/s13229-020-00387-6

Ceballos-Picot, I., Le Dantec, A., Brassier, A., Jaïs, J.-P., Ledroit, M., Cahu, J., Ea, H.-K., Daignan-Fornier, B., & Pinson, B. (2015). New biomarkers for early diagnosis of Lesch-Nyhan disease revealed by metabolic analysis on a large cohort of patients. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *10*(1), 7. https://doi.org/10.1186/s13023-014-0219-0

Ceballos-Picot, I., Mockel, L., Potier, M.-C., Dauphinot, L., Shirley, T. L., Torero-Ibad, R., Fuchs, J., & Jinnah, H. A. (2009). Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase regulates early developmental programming of dopamine neurons: Implications for Lesch-Nyhan disease pathogenesis.

Human Molecular Genetics, *18*(13), 2317-2327. https://doi.org/10.1093/hmg/ddp164

Chambers, S. M., Fasano, C. A., Papapetrou, E. P., Tomishima, M., Sadelain, M., & Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nature Biotechnology*, *27*(3), 275-280. https://doi.org/10.1038/nbt.1529

Chaudhuri, K. R., & Schapira, A. H. V. (2009). Non-motor symptoms of Parkinson's disease: Dopaminergic pathophysiology and treatment. *The Lancet. Neurology*, *8*(5), 464-474. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70068-7

Cheffer, A., Castillo, A. R. G., Corrêa-Velloso, J., Gonçalves, M. C. B., Naaldijk, Y., Nascimento, I. C., Burnstock, G., & Ulrich, H. (2018). Purinergic system in psychiatric diseases. *Molecular Psychiatry*, *23*(1), 94-106. https://doi.org/10.1038/mp.2017.188

Chen, B. C., Balasubramaniam, S., McGown, I. N., O'Neill, J. P., Chng, G. S., Keng, W. T., Ngu, L. H., & Duley, J. A. (2014). Treatment of Lesch–Nyhan disease with S-adenosylmethionine: Experience with five young Malaysians, including a girl. *Brain and Development*, *36*(7), 593-600. https://doi.org/10.1016/j.braindev.2013.08.013

Chen, G., Gulbranson, D. R., Hou, Z., Bolin, J. M., Ruotti, V., Probasco, M. D., Smuga-Otto, K., Howden, S. E., Diol, N. R., Propson, N. E., Wagner, R., Lee, G. O., Antosiewicz-Bourget, J., Teng, J. M. C., & Thomson, J. A. (2011). Chemically defined conditions for human iPS cell derivation and culture. *Nature methods*, *8*(5), 424-429. https://doi.org/10.1038/nmeth.1593

Cherchi, F., Pugliese, A. M., & Coppi, E. (2021). Oligodendrocyte precursor cell maturation: Role of adenosine receptors. *Neural Regeneration Research*, *16*(9), 1686-1692. https://doi.org/10.4103/1673-5374.306058

Chetty, S., Pagliuca, F. W., Honore, C., Kweudjeu, A., Rezania, A., & Melton, D. A. (2013). A simple tool to improve pluripotent stem cell differentiation. *Nature Methods*, *10*(6), 553-556. https://doi.org/10.1038/nmeth.2442

Chilov, D., Sinjushina, N., Saarimäki-Vire, J., Taketo, M. M., & Partanen, J. (2010). Beta-Catenin regulates intercellular signalling networks and cell-type specific transcription in the developing mouse midbrain-rhombomere 1 region. *PloS One*, *5*(6), e10881. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010881

Christenson, J. G., Dairman, W., & Udenfriend, S. (1972). On the Identity of DOPA Decarboxylase and 5-Hydroxytryptophan Decarboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *69*(2), 343-347. https://doi.org/10.1073/pnas.69.2.343

Chung, C. Y., Khurana, V., Auluck, P. K., Tardiff, D. F., Mazzulli, J. R., Soldner, F., Baru, V., Lou, Y., Freyzon, Y., Cho, S., Mungenast, A. E., Muffat, J., Mitalipova, M., Pluth, M. D., Jui, N. T., Schüle, B., Lippard, S. J., Tsai, L.-H., Krainc, D., … Lindquist, S. (2013). Identification and rescue of α-synuclein toxicity in Parkinson patient-derived neurons. *Science (New York, N.Y.)*, *342*(6161), 983-987. https://doi.org/10.1126/science.1245296

Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Li, T., Maserati, M., Lu, S.-J., Zdravkovic, T., Ilic, D., Genbacev, O., Fisher, S., Krtolica, A., & Lanza, R. (2008). Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. *Cell Stem Cell*, *2*(2), 113-117. https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.12.013

Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Marh, J., Lu, S.-J., Johnson, J., Meisner, L., & Lanza, R. (2006). Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature*, *439*(7073), 216-219. https://doi.org/10.1038/nature04277

Ciaranello, R. D., Anders, T. F., Barchas, J. D., Berger, P. A., & Cann, H. M. (1976). The use of 5-hydroxytryptophan in a child with Lesch-Nyhan syndrome. *Child Psychiatry and Human Development*, *7*(2), 127-133. https://doi.org/10.1007/BF01464036

Clevers, H. (2016). Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell*, *165*(7), 1586-1597. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.082

Colas, J. F., & Schoenwolf, G. C. (2001). Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *221*(2), 117-145. https://doi.org/10.1002/dvdy.1144

Coppi, E., Cherchi, F., Lucarini, E., Ghelardini, C., Pedata, F., Jacobson, K. A., Di Cesare Mannelli, L., Pugliese, A. M., & Salvemini, D. (2021). Uncovering the Mechanisms of Adenosine Receptor-Mediated Pain Control: Focus on the A3 Receptor Subtype. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(15), 7952. https://doi.org/10.3390/ijms22157952

Coppi, E., Cherchi, F., Venturini, M., Lucarini, E., Corradetti, R., Di Cesare Mannelli, L., Ghelardini, C., Pedata, F., & Pugliese, A. (2022). Therapeutic Potential of Highly Selective A3 Adenosine Receptor Ligands in the Central and Peripheral Nervous System. *Molecules*, *27*(6), 1890. https://doi.org/10.3390/molecules27061890

Cowan, C. A., Klimanskaya, I., McMahon, J., Atienza, J., Witmyer, J., Zucker, J. P., Wang, S., Morton, C. C., McMahon, A. P., Powers, D., & Melton, D. A. (2004). Derivation of Embryonic Stem-Cell Lines from Human Blastocysts. *New England Journal of Medicine*, *350*(13), 1353-1356. https://doi.org/10.1056/NEJMsr040330

Cristini, S., Navone, S., Canzi, L., Acerbi, F., Ciusani, E., Hladnik, U., de Gemmis, P., Alessandri, G., Colombo, A., Parati, E., & Invernici, G. (2010). Human neural stem cells: A model system for the study of Lesch-Nyhan disease neurological aspects. *Human Molecular Genetics*, *19*(10), 1939-1950. https://doi.org/10.1093/hmg/ddq072

Cuomo, A., Beccarini Crescenzi, B., Bolognesi, S., Goracci, A., Koukouna, D., Rossi, R., & Fagiolini, A. (2020). S-Adenosylmethionine (SAMe) in major depressive disorder (MDD): A clinician-oriented systematic review. *Annals of General Psychiatry*, *19*(1), 50. https://doi.org/10.1186/s12991-020-00298-z

Dabrowski, E., Smathers, S. A., Ralstrom, C. S., Nigro, M. A., & Leleszi, J. P. (2005). Botulinum toxin as a novel treatment for self-mutilation in Lesch-Nyhan syndrome. *Developmental Medicine and Child Neurology*, *47*(9), 636-639.

Dahlstroem, A., & Fuxe, K. (1964). EVIDENCE FOR THE EXISTENCE OF MONOAMINE-CONTAINING NEURONS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. I. DEMONSTRATION OF MONOAMINES IN THE CELL BODIES OF BRAIN STEM NEURONS. *Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum*, SUPPL 232:1-55.

Dakhore, S., Nayer, B., & Hasegawa, K. (2018). Human Pluripotent Stem Cell Culture: Current Status, Challenges, and Advancement. *Stem Cells International*, *2018*, 7396905. https://doi.org/10.1155/2018/7396905

Dammer, E. B., Göttle, M., Duong, D. M., Hanfelt, J., Seyfried, N. T., & Jinnah, H. A. (2015). Consequences of impaired purine recycling on the proteome in a cellular model of Lesch-Nyhan disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, *114*(4), 570-579. https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2015.02.007

Darville, H., Poulet, A., Rodet-Amsellem, F., Chatrousse, L., Pernelle, J., Boissart, C., Héron, D., Nava, C., Perrier, A., Jarrige, M., Cogé, F., Millan, M. J., Bourgeron, T., Peschanski, M., Delorme, R., & Benchoua, A. (2016). Human Pluripotent Stem Cell-derived Cortical Neurons for High Throughput Medication Screening in Autism: A Proof of Concept Study in SHANK3 Haploinsufficiency Syndrome. *EBioMedicine*, *9*, 293-305. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.05.032

De Sousa, P. A., Downie, J. M., Tye, B. J., Bruce, K., Dand, P., Dhanjal, S., Serhal, P., Harper, J., Turner, M., & Bateman, M. (2016). Development and production of good manufacturing practice grade human embryonic stem cell lines as source material for clinical application. *Stem Cell Research*, *17*(2), 379-390. https://doi.org/10.1016/j.scr.2016.08.011

de Almeida, P. E., Ransohoff, J. D., Nahid, A., & Wu, J. C. (2013). Immunogenicity of pluripotent stem cells and their derivatives. *Circulation Research*, *112*(3), 549-561. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.249243

Devine, D. P. (2019). Animal Models of Self-Injurious Behavior : An Update. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *2011*, 41-60. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9554-7_3

Devine, M. J., Ryten, M., Vodicka, P., Thomson, A. J., Burdon, T., Houlden, H., Cavaleri, F., Nagano, M., Drummond, N. J., Taanman, J.-W., Schapira, A. H., Gwinn, K., Hardy, J., Lewis, P. A., & Kunath, T. (2011). Parkinson's disease induced pluripotent stem cells with triplication of the α-synuclein locus. *Nature Communications*, *2*, 440. https://doi.org/10.1038/ncomms1453

Dewulf, J. P., Marie, S., & Nassogne, M.-C. (2022). Disorders of purine biosynthesis metabolism. *Molecular Genetics and Metabolism*, *136*(3), 190-198. https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2021.12.016

Di Giovannantonio, L. G., Di Salvio, M., Acampora, D., Prakash, N., Wurst, W., & Simeone, A. (2013). Otx2 selectively controls the neurogenesis of specific neuronal subtypes of the ventral tegmental area and compensates En1-dependent neuronal loss and MPTP vulnerability. *Developmental Biology*, *373*(1), 176-183. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.10.022

Di Salvio, M., Di Giovannantonio, L. G., Omodei, D., Acampora, D., & Simeone, A. (2010). Otx2 expression is restricted to dopaminergic neurons of the ventral tegmental area in the adult brain. *The International Journal of Developmental Biology*, *54*(5), 939-945. https://doi.org/10.1387/ijdb.092974ms

Dinasarapu, A. R., Sutcliffe, D. J., Seifar, F., Visser, J. E., & Jinnah, H. A. (2022). Abnormalities of neural stem cells in Lesch-Nyhan disease. *Journal of Neurogenetics*, *36*(2-3), 81-87. https://doi.org/10.1080/01677063.2022.2129632

Doi, D., Samata, B., Katsukawa, M., Kikuchi, T., Morizane, A., Ono, Y., Sekiguchi, K., Nakagawa, M., Parmar, M., & Takahashi, J. (2014). Isolation of human induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitors by cell sorting for successful transplantation. *Stem Cell Reports*, *2*(3), 337-350. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.01.013

Dolcetta, D., Parmigiani, P., Salmaso, L., Bernardelle, R., Cesari, U., Andrighetto, G., Baschirotto, G., Nyhan, W. L., & Hladnik, U. (2013). Quantitative evaluation of the clinical effects of S-adenosylmethionine on mood and behavior in Lesch-Nyhan patients. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, *32*(4), 174-188. https://doi.org/10.1080/15257770.2013.774012

Doucet-Beaupré, H., Gilbert, C., Profes, M. S., Chabrat, A., Pacelli, C., Giguère, N., Rioux, V., Charest, J., Deng, Q., Laguna, A., Ericson, J., Perlmann, T., Ang, S.-L., Cicchetti, F., Parent, M., Trudeau, L.-E., & Lévesque, M. (2016). Lmx1a and Lmx1b regulate mitochondrial functions and survival of adult midbrain dopaminergic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(30), E4387-E4396. https://doi.org/10.1073/pnas.1520387113

Downs, A. M., Roman, K. M., Campbell, S. A., Pisani, A., Hess, E. J., & Bonsi, P. (2019). The neurobiological basis for novel experimental therapeutics in dystonia. *Neurobiology of Disease*, *130*, 104526. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104526

Draper, J. S., Moore, H. D., Ruban, L. N., Gokhale, P. J., & Andrews, P. W. (2004). Culture and characterization of human embryonic stem cells. *Stem Cells and Development*, *13*(4), 325-336. https://doi.org/10.1089/scd.2004.13.325

Dunnett, S. B., Sirinathsinghji, D. J. S., Heavens, R., Rogers, D. C., & Kuehn, M. R. (1989). Monoamine deficiency in a transgenic (Hprt−) mouse model of Lesch-Nyhan syndrome. *Brain Research*, *501*(2), 401-406. https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90659-8

Eiraku, M., & Sasai, Y. (2012). Self-formation of layered neural structures in three-dimensional culture of ES cells. *Current Opinion in Neurobiology*, *22*(5), 768-777. https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.02.005

Eiraku, M., Watanabe, K., Matsuo-Takasaki, M., Kawada, M., Yonemura, S., Matsumura, M., Wataya, T., Nishiyama, A., Muguruma, K., & Sasai, Y. (2008). Self-Organized Formation of Polarized Cortical Tissues from ESCs and Its Active Manipulation by Extrinsic Signals. *Cell Stem Cell*, *3*(5), 519-532. https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.09.002

Eisenhofer, G., Kopin, I. J., & Goldstein, D. S. (2004). Catecholamine Metabolism: A Contemporary View with Implications for Physiology and Medicine. *Pharmacological Reviews*, *56*(3), 331-349. https://doi.org/10.1124/pr.56.3.1

Elsworth, J. D., & Roth, R. H. (1997). Dopamine Synthesis, Uptake, Metabolism, and Receptors: Relevance to Gene Therapy of Parkinson's Disease. *Experimental Neurology*, *144*(1), 4-9. https://doi.org/10.1006/exnr.1996.6379

Engle, S. J., Womer, D. E., Davies, P. M., Boivin, G., Sahota, A., Simmonds, H. A., Stambrook, P. J., & Tischfield, J. A. (1996). HPRT-APRT-deficient mice are not a model for lesch-nyhan syndrome. *Human Molecular Genetics*, *5*(10), 1607-1610. https://doi.org/10.1093/hmg/5.10.1607

Ernst, M., Zametkin, A. J., Matochik, J. A., Pascualvaca, D., Jons, P. H., Hardy, K., Hankerson, J. G., Doudet, D. J., & Cohen, R. M. (1996). Presynaptic Dopaminergic Deficits in Lesch–Nyhan Disease. *New England Journal of Medicine*, *334*(24), 1568-1572. https://doi.org/10.1056/NEJM199606133342403

Espinosa-Jeffrey, A., Blanchi, B., Biancotti, J. C., Kumar, S., Hirose, M., Mandefro, B., Talavera-Adame, D., Benvenisty, N., & de Vellis, J. (2016). Efficient Generation of Viral and Integration-Free Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Oligodendrocytes. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, *38*, 2D.18.1-2D.18.27. https://doi.org/10.1002/cpsc.11

Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, *292*(5819), 154-156. https://doi.org/10.1038/292154a0

Farr, S. A., Cuzzocrea, S., Esposito, E., Campolo, M., Niehoff, M. L., Doyle, T. M., & Salvemini, D. (2020). Adenosine A3 receptor as a novel therapeutic target to reduce secondary events and improve neurocognitive functions following traumatic brain injury. *Journal of Neuroinflammation*, *17*, 339. https://doi.org/10.1186/s12974-020-02009-7

Fattorelli, N., Martinez-Muriana, A., Wolfs, L., Geric, I., De Strooper, B., & Mancuso, R. (2021). Stem-cell-derived human microglia transplanted into mouse brain to study human disease. *Nature Protocols*, *16*(2), Art. 2. https://doi.org/10.1038/s41596-020-00447-4

Fernstrom, J. D., & Fernstrom, M. H. (2007). Tyrosine, Phenylalanine, and Catecholamine Synthesis and Function in the Brain. *The Journal of Nutrition*, *137*(6), 1539S-1547S. https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1539S

Ferré, S., Ciruela, F., Quiroz, C., Luján, R., Popoli, P., Cunha, R. A., Agnati, L. F., Fuxe, K., Woods, A. S., Lluis, C., & Franco, R. (2007). Adenosine receptor heteromers and their integrative role in striatal function. *TheScientificWorldJournal*, *7*, 74-85. https://doi.org/10.1100/tsw.2007.211

Ferri, A. L. M., Lin, W., Mavromatakis, Y. E., Wang, J. C., Sasaki, H., Whitsett, J. A., & Ang, S.-L. (2007). Foxa1 and Foxa2 regulate multiple phases of midbrain dopaminergic neuron development in a dosage-dependent manner. *Development (Cambridge, England)*, *134*(15), 2761-2769.

https://doi.org/10.1242/dev.000141

Fiorenzano, A., Sozzi, E., Birtele, M., Kajtez, J., Giacomoni, J., Nilsson, F., Bruzelius, A., Sharma, Y., Zhang, Y., Mattsson, B., Emnéus, J., Ottosson, D. R., Storm, P., & Parmar, M. (2021). Single-cell transcriptomics captures features of human midbrain development and dopamine neuron diversity in brain organoids. *Nature Communications*, *12*(1), 7302. https://doi.org/10.1038/s41467-021-27464-5

Fishman, P. (2022). Drugs Targeting the A3 Adenosine Receptor: Human Clinical Study Data. *Molecules*, *27*(12), 3680. https://doi.org/10.3390/molecules27123680

Fishman, P., Bar-Yehuda, S., Liang, B. T., & Jacobson, K. A. (2012). Pharmacological and therapeutic effects of A3 adenosine receptor agonists. *Drug Discovery Today*, *17*(7-8), 359-366. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.10.007

Floresco, S. B., West, A. R., Ash, B., Moore, H., & Grace, A. A. (2003). Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nature Neuroscience*, *6*(9), 968-973. https://doi.org/10.1038/nn1103

Francioso, A., Fanelli, S., d'Erme, M., Lendaro, E., Miraglia, N., Fontana, M., Cavallaro, R. A., & Mosca, L. (2021). Pharmacokinetic properties of a novel formulation of S-adenosyl-L-methionine phytate. *Amino Acids*, *53*(10), 1559-1568. https://doi.org/10.1007/s00726-021-03076-7

Freed, C. R., Breeze, R. E., Rosenberg, N. L., Schneck, S. A., Kriek, E., Qi, J. X., Lone, T., Zhang, Y. B., Snyder, J. A., & Wells, T. H. (1992). Survival of implanted fetal dopamine cells and neurologic improvement 12 to 46 months after transplantation for Parkinson's disease. *The New England Journal of Medicine*, *327*(22), 1549-1555. https://doi.org/10.1056/NEJM199211263272202

Fu, R., Ceballos-Picot, I., Torres, R. J., Larovere, L. E., Yamada, Y., Nguyen, K. V., Hegde, M., Visser, J. E., Schretlen, D. J., Nyhan, W. L., Puig, J. G., O'Neill, P. J., & Jinnah, H. A. (2014). Genotype–phenotype correlations in neurogenetics: Lesch-Nyhan disease as a model disorder. *Brain*, *137*(5), 1282-1303. https://doi.org/10.1093/brain/awt202

Fu, R., Sutcliffe, D., Zhao, H., Huang, X., Schretlen, D. J., Benkovic, S., & Jinnah, H. A. (2015). Clinical severity in Lesch-Nyhan disease: The role of residual enzyme and compensatory pathways. *Molecular Genetics and Metabolism*, *114*(1), 55-61. https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2014.11.001

Fuchs, J., Mueller, J. C., Lichtner, P., Schulte, C., Munz, M., Berg, D., Wüllner, U., Illig, T., Sharma, M., & Gasser, T. (2009). The transcription factor PITX3 is associated with sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, *30*(5), 731-738. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.08.014

Fumagalli, M., Lecca, D., & Abbracchio, M. P. (2016). CNS remyelination as a novel reparative approach to neurodegenerative diseases: The roles of purinergic signaling and the P2Y-like receptor GPR17. *Neuropharmacology*, *104*, 82-93. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.005

Fumagalli, M., Lecca, D., Abbracchio, M. P., & Ceruti, S. (2017). Pathophysiological Role of Purines and Pyrimidines in Neurodevelopment: Unveiling New Pharmacological Approaches to Congenital Brain Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, *8*, 941. https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00941

Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., & Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, *85*(8), 348-362. https://doi.org/10.2183/pjab.85.348

Fuxe, K., Marcellino, D., Borroto-Escuela, D. O., Guescini, M., Fernández-Dueñas, V., Tanganelli, S., Rivera, A., Ciruela, F., & Agnati, L. F. (2010). Adenosine-dopamine interactions in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, *16*(3), e18-42. https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2009.00126.x

Gale, E., & Li, M. (2008). Midbrain dopaminergic neuron fate specification: Of mice and embryonic stem cells. *Molecular Brain*, *1*, 8. https://doi.org/10.1186/1756-6606-1-8

Gao, Z.-G., Auchampach, J. A., & Jacobson, K. A. (2022). Species dependence of A3 adenosine receptor pharmacology and function. *Purinergic Signalling*, 1-28. https://doi.org/10.1007/s11302-022-09910-1

García, M. G., Puig, J. G., & Torres, R. J. (2009). Abnormal adenosine and dopamine receptor expression in lymphocytes of Lesch-Nyhan patients. *Brain, Behavior, and Immunity*, *23*(8), 1125-1131. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.07.006

García, M. G., Puig, J. G., & Torres, R. J. (2012). Adenosine, dopamine and serotonin receptors imbalance in lymphocytes of Lesch-Nyhan patients. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *35*(6), 1129-1135. https://doi.org/10.1007/s10545-012-9470-5

Garcia-Romero, M. D. M., Torres, R. J., Garcia-Puig, J., & Pascual-Pascual, S. I. (2022). Safety and Efficacy of Botulinum Toxin in the Treatment of Self-Biting Behavior in Lesch-Nyhan Disease. *Pediatric Neurology*, *127*, 6-10. https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2021.10.018

Garitaonandia, I., Amir, H., Boscolo, F. S., Wambua, G. K., Schultheisz, H. L., Sabatini, K., Morey, R., Waltz, S., Wang, Y.-C., Tran, H., Leonardo, T. R., Nazor, K., Slavin, I., Lynch, C., Li, Y., Coleman, R., Gallego Romero, I., Altun, G., Reynolds, D., … Laurent, L. C. (2015). Increased risk of genetic and epigenetic instability in human embryonic stem cells associated with specific culture conditions. *PloS One*, *10*(2), e0118307. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118307

Georges, P., Boissart, C., Poulet, A., Peschanski, M., & Benchoua, A. (2015). Protein Kinase-A Inhibition Is Sufficient to Support Human Neural Stem Cells Self-Renewal. *Stem Cells*, *33*(12), 3666-3672. https://doi.org/10.1002/stem.2194

German, D. C., Schlusselberg, D. S., & Woodward, D. J. (1983). Three-dimensional computer reconstruction of midbrain dopaminergic neuronal populations: From mouse to man. *Journal of Neural Transmission*, *57*(4), 243-254. https://doi.org/10.1007/BF01248996

Giacalone, J. C., Sharma, T. P., Burnight, E. R., Fingert, J. F., Mullins, R. F., Stone, E. M., & Tucker, B. A. (2018). CRISPR-Cas9-Based Genome Editing of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, *44*, 5B.7.1-5B.7.22. https://doi.org/10.1002/cpsc.46

Gilbert, C., Sauer, M., & Cheng, J. (2021). Reduction of self-mutilating behavior and improved oromotor function in a patient with Lesch-Nyhan syndrome following botulinum toxin injection: A case report. *Journal of Pediatric Rehabilitation Medicine*, *14*(1), 133-136. https://doi.org/10.3233/PRM-200729

Gizer, I. R., Ficks, C., & Waldman, I. D. (2009). Candidate gene studies of ADHD: A meta-analytic review. *Human Genetics*, *126*(1), 51-90. https://doi.org/10.1007/s00439-009-0694-x

Goldstein, M., Anderson, L. T., Reuben, R., & Dancis, J. (1985). Self-mutilation in Lesch-Nyhan disease is caused by dopaminergic denervation. *Lancet (London, England)*, *1*(8424), 338-339. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(85)91107-9

Goldstein, M., Kuga, S., Kusano, N., Meller, E., Dancis, J., & Schwarcz, R. (1986). Dopamine agonist induced self-mutilative biting behavior in monkeys with unilateral ventromedial tegmental lesions of the brainstem: Possible pharmacological model for Lesch-Nyhan syndrome. *Brain Research*, *367*(1-2), 114-120. https://doi.org/10.1016/0006-8993(86)91584-2

Göttle, M., Prudente, C. N., Fu, R., Sutcliffe, D., Pang, H., Cooper, D., Veledar, E., Glass, J. D., Gearing, M., Visser, J. E., & Jinnah, H. A. (2014). Loss of dopamine phenotype among midbrain neurons in Lesch-Nyhan disease: Neuropathology of LND. *Annals of Neurology*, *76*(1), 95-107. https://doi.org/10.1002/ana.24191

Grace, A. A. (2016). Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. *Nature Reviews. Neuroscience*, *17*(8), 524-532. https://doi.org/10.1038/nrn.2016.57

Grealish, S., Diguet, E., Kirkeby, A., Mattsson, B., Heuer, A., Bramoulle, Y., Van Camp, N., Perrier, A. L., Hantraye, P., Björklund, A., & Parmar, M. (2014). Human ESC-derived dopamine neurons show similar preclinical efficacy and potency to fetal neurons when grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Cell Stem Cell*, *15*(5), 653-665. https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.09.017

Guibinga, G.-H., Hrustanovic, G., Bouic, K., Jinnah, H. A., & Friedmann, T. (2012). MicroRNA-mediated dysregulation of neural developmental genes in HPRT deficiency: Clues for Lesch–Nyhan disease? *Human Molecular Genetics*, *21*(3), 609-622. https://doi.org/10.1093/hmg/ddr495

Guibinga, G.-H., Hsu, S., & Friedmann, T. (2010). Deficiency of the housekeeping gene hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) dysregulates neurogenesis. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, *18*(1), 54-62. https://doi.org/10.1038/mt.2009.178

Guibinga, G.-H., Murray, F., & Barron, N. (2013). HPRT-deficiency dysregulates cAMP-PKA signaling and phosphodiesterase 10A expression: Mechanistic insight and potential target for Lesch-Nyhan Disease? *PloS One*, *8*(5), e63333. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063333

Guillot, T. S., & Miller, G. W. (2009). Protective Actions of the Vesicular Monoamine Transporter 2 (VMAT2) in Monoaminergic Neurons. *Molecular Neurobiology*, *39*(2), 149-170. https://doi.org/10.1007/s12035-009-8059-y

Gurdon, J. B. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, *10*, 622-640.

Gutierrez, C., Pellene, A., & Micheli, F. (2008). Botulinum toxin: Treatment of self-mutilation in patients with Lesch-Nyhan syndrome. *Clinical Neuropharmacology*, *31*(3), 180-183. https://doi.org/10.1097/WNF.0b013e31814a62cc

Haeusler, D., Grassinger, L., Fuchshuber, F., Hörleinsberger, W. J., Höftberger, R., Leisser, I., Girschele, F., Shanab, K., Spreitzer, H., Gerdenitsch, W., Hacker, M., Wadsak, W., & Mitterhauser, M. (2015). Hide and seek: A comparative autoradiographic in vitro investigation of the adenosine A3 receptor. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, *42*(6), 928-939. https://doi.org/10.1007/s00259-014-2985-2

Hamilton, P. J., Campbell, N. G., Sharma, S., Erreger, K., Herborg Hansen, F., Saunders, C., Belovich, A. N., NIH ARRA Autism Sequencing Consortium, Sahai, M. A., Cook, E. H., Gether, U., McHaourab, H. S., Matthies, H. J. G., Sutcliffe, J. S., & Galli, A. (2013). De novo mutation in the dopamine transporter gene associates dopamine dysfunction with autism spectrum disorder. *Molecular Psychiatry*, *18*(12), 1315-1323. https://doi.org/10.1038/mp.2013.102

Hang, L., Thundyil, J., Goh, G. W. Y., & Lim, K.-L. (2019). AMP Kinase Activation is Selectively Disrupted in the Ventral Midbrain of Mice Deficient in Parkin or PINK1 Expression. *Neuromolecular Medicine*, *21*(1), 25-32. https://doi.org/10.1007/s12017-018-8517-7

Harada, H., Sato, T., & Nakamura, H. (2016). Fgf8 signaling for development of the midbrain and hindbrain. *Development, Growth & Differentiation*, *58*(5), 437-445. https://doi.org/10.1111/dgd.12293

Harrington, K. A., Augood, S. J., Kingsbury, A. E., Foster, O. J. F., & Emson, P. C. (1996). Dopamine transporter (DAT) and synaptic vesicle amine transporter (VMAT2) gene expression in the substantia nigra of control and Parkinson's disease. *Molecular Brain Research*, *36*(1), 157-162. https://doi.org/10.1016/0169-328X(95)00278-Z

Harris, J. C. (2018). Lesch–Nyhan syndrome and its variants: Examining the behavioral and neurocognitive

phenotype. *Current Opinion in Psychiatry*, *31*(2), 96-102. https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000388

Harris, J. C., Lee, R. R., Jinnah, H. A., Wong, D. F., Yaster, M., & Bryan, R. N. (1998). Craniocerebral magnetic resonance imaging measurement and findings in Lesch-Nyhan syndrome. *Archives of Neurology*, *55*(4), 547-553. https://doi.org/10.1001/archneur.55.4.547

Hasler, R., Salzmann, A., Bolzan, T., Zimmermann, J., Baud, P., Giannakopoulos, P., & Perroud, N. (2015). DAT1 and DRD4 genes involved in key dimensions of adult ADHD. *Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, *36*(6), 861-869. https://doi.org/10.1007/s10072-014-2051-7

Haubenberger, D., Reinthaler, E., Mueller, J. C., Pirker, W., Katzenschlager, R., Froehlich, R., Bruecke, T., Daniel, G., Auff, E., & Zimprich, A. (2011). Association of transcription factor polymorphisms PITX3 and EN1 with Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, *32*(2), 302-307. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.02.015

Hegarty, S. V., Sullivan, A. M., & O'Keeffe, G. W. (2013). Midbrain dopaminergic neurons: A review of the molecular circuitry that regulates their development. *Developmental Biology*, *379*(2), 123-138. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.04.014

Heine, C., Sygnecka, K., & Franke, H. (2016). Purines in neurite growth and astroglia activation. *Neuropharmacology*, *104*, 255-271. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.022

Henry, M. P., Hawkins, J. R., Boyle, J., & Bridger, J. M. (2018). The Genomic Health of Human Pluripotent Stem Cells: Genomic Instability and the Consequences on Nuclear Organization. *Frontiers in Genetics*, *9*, 623. https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00623

Hester, M. E., Murtha, M. J., Song, S., Rao, M., Miranda, C. J., Meyer, K., Tian, J., Boulting, G., Schaffer, D. V., Zhu, M. X., Pfaff, S. L., Gage, F. H., & Kaspar, B. K. (2011). Rapid and efficient generation of functional motor neurons from human pluripotent stem cells using gene delivered transcription factor codes. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, *19*(10), 1905-1912. https://doi.org/10.1038/mt.2011.135

Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S., & Monk, M. (1987). HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature*, *326*(6110), 292-295. https://doi.org/10.1038/326292a0

Hornykiewicz, O. (2002). L-DOPA: From a biologically inactive amino acid to a successful therapeutic agent. *Amino Acids*, *23*(1-3), 65-70. https://doi.org/10.1007/s00726-001-0111-9

Howes, O. D., McCutcheon, R., Owen, M. J., & Murray, R. (2017). The role of genes, stress and dopamine in the development of schizophrenia. *Biological psychiatry*, *81*(1), 9-20. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.07.014

Hwang, D.-Y., Hong, S., Jeong, J.-W., Choi, S., Kim, H., Kim, J., & Kim, K.-S. (2009). Vesicular monoamine transporter 2 and dopamine transporter are molecular targets of Pitx3 in the ventral midbrain dopamine neurons. *Journal of Neurochemistry*, *111*(5), 1202-1212. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06404.x

Hyland, K., Kasim, S., Egami, K., Arnold, L. A., & Jinnah, H. A. (2004). Tetrahydrobiopterin deficiency and dopamine loss in a genetic mouse model of Lesch-Nyhan disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *27*(2), 165-178. https://doi.org/10.1023/B:BOLI.0000028728.93113.4d

Ilic, D., & Ogilvie, C. (2017). Concise Review: Human Embryonic Stem Cells—What Have We Done? What Are We Doing? Where Are We Going? *Stem Cells*, *35*(1), 17-25. https://doi.org/10.1002/stem.2450

Isotani, A., Yamagata, K., Okabe, M., & Ikawa, M. (2016). Generation of Hprt-disrupted rat through

mouse←rat ES chimeras. *Scientific Reports*, *6*, 24215. https://doi.org/10.1038/srep24215

Jaber, M., Robinson, S. W., Missale, C., & Caron, M. G. (1996). Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology*, *35*(11), 1503-1519. https://doi.org/10.1016/s0028-3908(96)00100-1

Jacobs, F. M. J., van Erp, S., van der Linden, A. J. A., von Oerthel, L., Burbach, J. P. H., & Smidt, M. P. (2009). Pitx3 potentiates Nurr1 in dopamine neuron terminal differentiation through release of SMRT-mediated repression. *Development*, *136*(4), 531-540. https://doi.org/10.1242/dev.029769

Jacobs, F. M. J., Veenvliet, J. V., Almirza, W. H., Hoekstra, E. J., von Oerthel, L., van der Linden, A. J. A., Neijts, R., Koerkamp, M. G., van Leenen, D., Holstege, F. C. P., Burbach, J. P. H., & Smidt, M. P. (2011). Retinoic acid-dependent and -independent gene-regulatory pathways of Pitx3 in meso-diencephalic dopaminergic neurons. *Development*, *138*(23), 5213-5222. https://doi.org/10.1242/dev.071704

Jacobson, K. A., Merighi, S., Varani, K., Borea, P. A., Baraldi, S., Tabrizi, M. A., Romagnoli, R., Baraldi, P. G., Ciancetta, A., Tosh, D. K., Gao, Z.-G., & Gessi, S. (2018). A3 Adenosine Receptors as Modulators of Inflammation: From Medicinal Chemistry to Therapy. *Medicinal research reviews*, *38*(4), 1031-1072. https://doi.org/10.1002/med.21456

Jankovic, J., Caskey, T. C., Stout, J. T., & Butler, I. J. (1988). Lesch-nyhan syndrome: A study of motor behavior and cerebrospinal fluid neurotransmitters. *Annals of Neurology*, *23*(5), 466-469. https://doi.org/10.1002/ana.410230507

Jankovic, J., Chen, S., & Le, W. D. (2005). The role of Nurr1 in the development of dopaminergic neurons and Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, *77*(1-2), 128-138. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.09.001

Jinnah, H. A., Ceballos-Picot, I., Torres, R. J., Visser, J. E., Schretlen, D. J., Verdu, A., Larovere, L. E., Chen, C.-J., Cossu, A., Wu, C.-H., Sampat, R., Chang, S.-J., de Kremer, R. D., Nyhan, W., Harris, J. C., Reich, S. G., Puig, J. G., & for the Lesch-Nyhan Disease International Study Group. (2010). Attenuated variants of Lesch-Nyhan disease. *Brain*, *133*(3), 671-689. https://doi.org/10.1093/brain/awq013

Jinnah, H. A., Gage, F. H., & Friedmann, T. (1991). Amphetamine-induced behavioral phenotype in a hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase-deficient mouse model of Lesch-Nyhan syndrome. *Behavioral Neuroscience*, *105*(6), 1004-1012. https://doi.org/10.1037//0735-7044.105.6.1004

Jinnah, H. A., Neychev, V., & Hess, E. J. (2017). The Anatomical Basis for Dystonia: The Motor Network Model. *Tremor and Other Hyperkinetic Movements (New York, N.Y.)*, *7*, 506. https://doi.org/10.7916/D8V69X3S

Jinnah, H. A., Page, T., & Friedmann, T. (1993). Brain purines in a genetic mouse model of Lesch-Nyhan disease. *Journal of Neurochemistry*, *60*(6), 2036-2045. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb03488.x

Jinnah, H. A., Sabina, R. L., & Van Den Berghe, G. (2013). Metabolic disorders of purine metabolism affecting the nervous system. *Handbook of Clinical Neurology*, *113*, 1827-1836. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59565-2.00052-6

Jinnah, H. A., Visser, J. E., Harris, J. C., Verdu, A., Larovere, L., Ceballos-Picot, I., Gonzalez-Alegre, P., Neychev, V., Torres, R. J., Dulac, O., Desguerre, I., Schretlen, D. J., Robey, K. L., Barabas, G., Bloem, B. R., Nyhan, W., De Kremer, R., Eddey, G. E., Puig, J. G., & Reich, S. G. (2006). Delineation of the motor disorder of Lesch–Nyhan disease. *Brain*, *129*(5), 1201-1217. https://doi.org/10.1093/brain/awl056

Jinnah, H., Wojcik, B., Hunt, M., Narang, N., Lee, K., Goldstein, M., Wamsley, J., Langlais, P., & Friedmann, T. (1994). Dopamine deficiency in a genetic mouse model of Lesch-Nyhan disease. *The Journal*

of Neuroscience, *14*(3), 1164-1175. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-03-01164.1994

Jo, J., Xiao, Y., Sun, A. X., Cukuroglu, E., Tran, H.-D., Göke, J., Tan, Z. Y., Saw, T. Y., Tan, C.-P., Lokman, H., Lee, Y., Kim, D., Ko, H. S., Kim, S.-O., Park, J. H., Cho, N.-J., Hyde, T. M., Kleinman, J. E., Shin, J. H., … Ng, H.-H. (2016). Midbrain-like Organoids from Human Pluripotent Stem Cells Contain Functional Dopaminergic and Neuromelanin-Producing Neurons. *Cell Stem Cell*, *19*(2), 248-257. https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.07.005

Joksimovic, M., & Awatramani, R. (2014). Wnt/β-catenin signaling in midbrain dopaminergic neuron specification and neurogenesis. *Journal of Molecular Cell Biology*, *6*(1), 27-33. https://doi.org/10.1093/jmcb/mjt043

Joksimovic, M., Patel, M., Taketo, M. M., Johnson, R., & Awatramani, R. (2012). Ectopic Wnt/Beta–Catenin Signaling Induces Neurogenesis in the Spinal Cord and Hindbrain Floor Plate. *PLoS ONE*, *7*(1), e30266. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030266

Joksimovic, M., Yun, B. A., Kittappa, R., Anderegg, A. M., Chang, W. W., Taketo, M. M., McKay, R. D. G., & Awatramani, R. B. (2009). Wnt antagonism of Shh facilitates midbrain floor plate neurogenesis. *Nature Neuroscience*, *12*(2), 125-131. https://doi.org/10.1038/nn.2243

Jolly, D. J., Okayama, H., Berg, P., Esty, A. C., Filpula, D., Bohlen, P., Johnson, G. G., Shively, J. E., Hunkapillar, T., & Friedmann, T. (1983). Isolation and characterization of a full-length expressible cDNA for human hypoxanthine phosphoribosyl transferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *80*(2), 477-481. https://doi.org/10.1073/pnas.80.2.477

Joyner, A. L., Liu, A., & Millet, S. (2000). Otx2, Gbx2 and Fgf8 interact to position and maintain a mid–hindbrain organizer. *Current Opinion in Cell Biology*, *12*(6), 736-741. https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00161-7

Kang, T. H., Guibinga, G.-H., & Friedmann, T. (2011). HPRT Deficiency Coordinately Dysregulates Canonical Wnt and Presenilin-1 Signaling: A Neuro-Developmental Regulatory Role for a Housekeeping Gene? *PLoS ONE*, *6*(1), e16572. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016572

Karagiannis, P., Takahashi, K., Saito, M., Yoshida, Y., Okita, K., Watanabe, A., Inoue, H., Yamashita, J. K., Todani, M., Nakagawa, M., Osawa, M., Yashiro, Y., Yamanaka, S., & Osafune, K. (2019). Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development. *Physiological Reviews*, *99*(1), 79-114. https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2017

Karimi, M., & Perlmutter, J. S. (2015). The role of dopamine and dopaminergic pathways in dystonia: Insights from neuroimaging. *Tremor and Other Hyperkinetic Movements (New York, N.Y.)*, *5*, 280. https://doi.org/10.7916/D8J101XV

Kaufmann, M., Schuffenhauer, A., Fruh, I., Klein, J., Thiemeyer, A., Rigo, P., Gomez-Mancilla, B., Heidinger-Millot, V., Bouwmeester, T., Schopfer, U., Mueller, M., Fodor, B. D., & Cobos-Correa, A. (2015). High-Throughput Screening Using iPSC-Derived Neuronal Progenitors to Identify Compounds Counteracting Epigenetic Gene Silencing in Fragile X Syndrome. *Journal of Biomolecular Screening*, *20*(9), 1101-1111. https://doi.org/10.1177/1087057115588287

Kebabian, J. W., & Calne, D. B. (1979). Multiple receptors for dopamine. *Nature*, *277*(5692), 93-96. https://doi.org/10.1038/277093a0

Keebaugh, A. C., Sullivan, R. T., NISC Comparative Sequencing Program, & Thomas, J. W. (2007). Gene duplication and inactivation in the HPRT gene family. *Genomics*, *89*(1), 134-142. https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2006.07.003

Kegeles, L. S., Abi-Dargham, A., Frankle, W. G., Gil, R., Cooper, T. B., Slifstein, M., Hwang, D.-R., Huang, Y., Haber, S. N., & Laruelle, M. (2010). Increased synaptic dopamine function in associative regions of the striatum in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, *67*(3), 231-239.

https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2010.10

Kele, J., Simplicio, N., Ferri, A. L. M., Mira, H., Guillemot, F., Arenas, E., & Ang, S.-L. (2006). Neurogenin 2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons. *Development (Cambridge, England)*, *133*(3), 495-505. https://doi.org/10.1242/dev.02223

Kelley, W. N., Rosenbloom, F. M., Henderson, J. F., & Seegmiller, J. E. (1967). A specific enzyme defect in gout associated with overproduction of uric acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *57*(6), 1735-1739. https://doi.org/10.1073/pnas.57.6.1735

Kenny, P. J., Voren, G., & Johnson, P. M. (2013). Dopamine D2 receptors and striatopallidal transmission in addiction and obesity. *Current Opinion in Neurobiology*, *23*(4), 535-538. https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.04.012

Khasnavis, T., Reiner, G., Sommerfeld, B., Nyhan, W. L., Chipkin, R., & Jinnah, H. A. (2016). A clinical trial of safety and tolerability for the selective dopamine D1 receptor antagonist ecopipam in patients with Lesch-Nyhan disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, *117*(4), 401-406. https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.02.005

Khasnavis, T., Torres, R. J., Sommerfeld, B., Puig, J. G., Chipkin, R., & Jinnah, H. A. (2016). A double-blind, placebo-controlled, crossover trial of the selective dopamine D1 receptor antagonist ecopipam in patients with Lesch-Nyhan disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, *118*(3), 160-166. https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2016.04.012

Kikuchi, T., Morizane, A., Doi, D., Magotani, H., Onoe, H., Hayashi, T., Mizuma, H., Takara, S., Takahashi, R., Inoue, H., Morita, S., Yamamoto, M., Okita, K., Nakagawa, M., Parmar, M., & Takahashi, J. (2017). Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model. *Nature*, *548*(7669), 592-596. https://doi.org/10.1038/nature23664

Kim, T. H., Kim, Y. K., & Woo, J. S. (2012). The adenosine A3 receptor agonist Cl-IB-MECA induces cell death through Ca^{2+}/ROS-dependent down regulation of ERK and Akt in A172 human glioma cells. *Neurochemical Research*, *37*(12), 2667-2677. https://doi.org/10.1007/s11064-012-0855-5

Kirkeby, A., Grealish, S., Wolf, D. A., Nelander, J., Wood, J., Lundblad, M., Lindvall, O., & Parmar, M. (2012). Generation of Regionally Specified Neural Progenitors and Functional Neurons from Human Embryonic Stem Cells under Defined Conditions. *Cell Reports*, *1*(6), 703-714. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.04.009

Klein, M. O., Battagello, D. S., Cardoso, A. R., Hauser, D. N., Bittencourt, J. C., & Correa, R. G. (2019). Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *39*(1), 31-59. https://doi.org/10.1007/s10571-018-0632-3

Klimanskaya, I., Chung, Y., Becker, S., Lu, S.-J., & Lanza, R. (2006). Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature*, *444*(7118), 481-485. https://doi.org/10.1038/nature05142

Kondo, T., Asai, M., Tsukita, K., Kutoku, Y., Ohsawa, Y., Sunada, Y., Imamura, K., Egawa, N., Yahata, N., Okita, K., Takahashi, K., Asaka, I., Aoi, T., Watanabe, A., Watanabe, K., Kadoya, C., Nakano, R., Watanabe, D., Maruyama, K., … Inoue, H. (2013). Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular Aβ and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell*, *12*(4), 487-496. https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.01.009

Kouwenhoven, W. M., von Oerthel, L., & Smidt, M. P. (2017). Pitx3 and En1 determine the size and molecular programming of the dopaminergic neuronal pool. *PloS One*, *12*(8), e0182421. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182421

Kriks, S., Shim, J.-W., Piao, J., Ganat, Y. M., Wakeman, D. R., Xie, Z., Carrillo-Reid, L., Auyeung, G., Antonacci, C., Buch, A., Yang, L., Beal, M. F., Surmeier, D. J., Kordower, J. H., Tabar, V., & Studer, L. (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of

Parkinson's disease. *Nature*, *480*(7378), 547-551. https://doi.org/10.1038/nature10648

Kropp, C., Kempf, H., Halloin, C., Robles-Diaz, D., Franke, A., Scheper, T., Kinast, K., Knorpp, T., Joos, T. O., Haverich, A., Martin, U., Zweigerdt, R., & Olmer, R. (2016). Impact of Feeding Strategies on the Scalable Expansion of Human Pluripotent Stem Cells in Single-Use Stirred Tank Bioreactors. *Stem Cells Translational Medicine*, *5*(10), 1289-1301. https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0253

Kuehn, M. R., Bradley, A., Robertson, E. J., & Evans, M. J. (1987). A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. *Nature*, *326*(6110), 295-298. https://doi.org/10.1038/326295a0

Kumar, M., Kaushalya, S. K., Gressens, P., Maiti, S., & Mani, S. (2009). Optimized derivation and functional characterization of 5-HT neurons from human embryonic stem cells. *Stem Cells and Development*, *18*(4), 615-627. https://doi.org/10.1089/scd.2008.0181

Kumari, D., Swaroop, M., Southall, N., Huang, W., Zheng, W., & Usdin, K. (2015). High-Throughput Screening to Identify Compounds That Increase Fragile X Mental Retardation Protein Expression in Neural Stem Cells Differentiated From Fragile X Syndrome Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Translational Medicine*, *4*(7), 800-808. https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0278

La Manno, G., Gyllborg, D., Codeluppi, S., Nishimura, K., Salto, C., Zeisel, A., Borm, L. E., Stott, S. R. W., Toledo, E. M., Villaescusa, J. C., Lönnerberg, P., Ryge, J., Barker, R. A., Arenas, E., & Linnarsson, S. (2016). Molecular Diversity of Midbrain Development in Mouse, Human, and Stem Cells. *Cell*, *167*(2), 566-580.e19. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.027

Laguna, A., Schintu, N., Nobre, A., Alvarsson, A., Volakakis, N., Jacobsen, J. K., Gómez-Galán, M., Sopova, E., Joodmardi, E., Yoshitake, T., Deng, Q., Kehr, J., Ericson, J., Svenningsson, P., Shupliakov, O., & Perlmann, T. (2015). Dopaminergic control of autophagic-lysosomal function implicates Lmx1b in Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, *18*(6), 826-835. https://doi.org/10.1038/nn.4004

Lake, C. R., & Ziegler, M. G. (1977). Lesch-Nyhan Syndrome: Low Dopamine-β-Hydroxylase Activity and Diminished Sympathetic Response to Stress and Posture. *Science*, *196*(4292), 905-906. https://doi.org/10.1126/science.860124

Lancaster, M. A., & Knoblich, J. A. (2014). Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, *9*(10), 2329-2340. https://doi.org/10.1038/nprot.2014.158

Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C.-A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurles, M. E., Homfray, T., Penninger, J. M., Jackson, A. P., & Knoblich, J. A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, *501*(7467), 373-379. https://doi.org/10.1038/nature12517

Lauber, M., Plecko, B., Pfiffner, M., Nuoffer, J.-M., & Häberle, J. (2017). The Effect of S-Adenosylmethionine on Self-Mutilation in a Patient with Lesch-Nyhan Disease. *JIMD Reports*, *32*, 51-57. https://doi.org/10.1007/8904_2016_571

Le, W., Nguyen, D., Lin, X. W., Rawal, P., Huang, M., Ding, Y., Xie, W., Deng, H., & Jankovic, J. (2011). Transcription factor PITX3 gene in Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, *32*(4), 750-753. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2009.03.015

Le, W., Xu, P., Jankovic, J., Jiang, H., Appel, S. H., Smith, R. G., & Vassilatis, D. K. (2003). Mutations in NR4A2 associated with familial Parkinson disease. *Nature Genetics*, *33*(1), Art. 1. https://doi.org/10.1038/ng1066

Lecca, D., Fumagalli, M., Ceruti, S., & Abbracchio, M. P. (2016). Intertwining extracellular nucleotides and their receptors with Ca2+ in determining adult neural stem cell survival, proliferation and final fate. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*,

371(1700), 20150433. https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0433

Ledonne, A., & Mercuri, N. B. (2017). Current Concepts on the Physiopathological Relevance of Dopaminergic Receptors. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *11*. https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00027

Lee, A. S., Tang, C., Rao, M. S., Weissman, I. L., & Wu, J. C. (2013). Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies. *Nature Medicine*, *19*(8), 998-1004. https://doi.org/10.1038/nm.3267

Lefort, N., Feyeux, M., Bas, C., Féraud, O., Bennaceur-Griscelli, A., Tachdjian, G., Peschanski, M., & Perrier, A. L. (2008). Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nature Biotechnology*, *26*(12), 1364-1366. https://doi.org/10.1038/nbt.1509

Lefort, N., Perrier, A. L., Laâbi, Y., Varela, C., & Peschanski, M. (2009). Human embryonic stem cells and genomic instability. *Regenerative Medicine*, *4*(6), 899-909. https://doi.org/10.2217/rme.09.63

Lesch, M., & Nyhan, W. L. (1964). A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. *The American Journal of Medicine*, *36*(4), 561-570. https://doi.org/10.1016/0002-9343(64)90104-4

Levenstein, M. E., Ludwig, T. E., Xu, R.-H., Llanas, R. A., VanDenHeuvel-Kramer, K., Manning, D., & Thomson, J. A. (2006). Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *24*(3), 568-574. https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0247

Leventoux, N., Morimoto, S., Imaizumi, K., Sato, Y., Takahashi, S., Mashima, K., Ishikawa, M., Sonn, I., Kondo, T., Watanabe, H., & Okano, H. (2020). Human Astrocytes Model Derived from Induced Pluripotent Stem Cells. *Cells*, *9*(12), 2680. https://doi.org/10.3390/cells9122680

Lewers, J. C., Ceballos-Picot, I., Shirley, T. L., Mockel, L., Egami, K., & Jinnah, H. A. (2008). Consequences of impaired purine recycling in dopaminergic neurons. *Neuroscience*, *152*(3), 761-772. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.10.065

Li, J. Y., & Joyner, A. L. (2001). Otx2 and Gbx2 are required for refinement and not induction of mid-hindbrain gene expression. *Development (Cambridge, England)*, *128*(24), 4979-4991. https://doi.org/10.1242/dev.128.24.4979

Lindvall, O., Brundin, P., Widner, H., Rehncrona, S., Gustavii, B., Frackowiak, R., Leenders, K. L., Sawle, G., Rothwell, J. C., & Marsden, C. D. (1990). Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science (New York, N.Y.)*, *247*(4942), 574-577. https://doi.org/10.1126/science.2105529

Little, D., Luft, C., Mosaku, O., Lorvellec, M., Yao, Z., Paillusson, S., Kriston-Vizi, J., Gandhi, S., Abramov, A. Y., Ketteler, R., Devine, M. J., & Gissen, P. (2018). A single cell high content assay detects mitochondrial dysfunction in iPSC-derived neurons with mutations in SNCA. *Scientific Reports*, *8*(1), 9033. https://doi.org/10.1038/s41598-018-27058-0

Liu, A., & Joyner, A. L. (2001). EN and GBX2 play essential roles downstream of FGF8 in patterning the mouse mid/hindbrain region. *Development*, *128*(2), 181-191. https://doi.org/10.1242/dev.128.2.181

Liu, A., & Niswander, L. A. (2005). Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*(12), 945-954. https://doi.org/10.1038/nrn1805

Liu, Y., Liu, H., Sauvey, C., Yao, L., Zarnowska, E. D., & Zhang, S.-C. (2013). Directed differentiation of forebrain GABA interneurons from human pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, *8*(9), 1670-1679. https://doi.org/10.1038/nprot.2013.106

Lloyd, K. G., Hornykiewicz, O., Davidson, L., Shannak, K., Farley, I., Goldstein, M., Shibuya, M., Kelley, W. N., & Fox, I. H. (1981). Biochemical evidence of dysfunction of brain neurotransmitters in the

Lesch-Nyhan syndrome. *The New England Journal of Medicine*, *305*(19), 1106-1111. https://doi.org/10.1056/NEJM198111053051902

Lo Giudice, M., Mihalik, B., Turi, Z., Dinnyés, A., & Kobolák, J. (2019). Calcilytic NPS 2143 Reduces Amyloid Secretion and Increases sAβPPα Release from PSEN1 Mutant iPSC-Derived Neurons. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, *72*(3), 885-899. https://doi.org/10.3233/JAD-190602

López, J. M. (2008). Is ZMP the toxic metabolite in Lesch–Nyhan disease? *Medical Hypotheses*, *71*(5), 657-663. https://doi.org/10.1016/j.mehy.2008.06.033

López, J. M., Outtrim, E. L., Fu, R., Sutcliffe, D. J., Torres, R. J., & Jinnah, H. A. (2020). Physiological levels of folic acid reveal purine alterations in Lesch-Nyhan disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(22), 12071-12079. https://doi.org/10.1073/pnas.2003475117

Lowy, B. A., & Williams, M. K. (1977). Lesch-Nyhan syndrome: The synthesis of inosine 5′-phosphate in the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase-deficient erythrocyte by alternate biochemical pathways. *Pediatric Research*, *11*(5), 691-694. https://doi.org/10.1203/00006450-197705000-00013

Lu, J., Zhong, X., Liu, H., Hao, L., Huang, C. T.-L., Sherafat, M. A., Jones, J., Ayala, M., Li, L., & Zhang, S.-C. (2016). Generation of serotonin neurons from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, *34*(1), 89-94. https://doi.org/10.1038/nbt.3435

Luo, S. X., & Huang, E. J. (2016). Dopaminergic Neurons and Brain Reward Pathways. *The American Journal of Pathology*, *186*(3), 478-488. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.09.023

Lyons, K. E., Pahwa, R., Hermanowicz, N., Davis, T., Pagan, F., & Isaacson, S. (2019). Changing the treatment paradigm for Parkinson's disease psychosis with pimavanserin. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, *12*(7), 681-691. https://doi.org/10.1080/17512433.2019.1623669

Madeo, A., Di Rocco, M., Brassier, A., Bahi-Buisson, N., De Lonlay, P., & Ceballos-Picot, I. (2019). Clinical, biochemical and genetic characteristics of a cohort of 101 French and Italian patients with HPRT deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*, *127*(2), 147-157. https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.06.001

Magrinelli, F., Picelli, A., Tocco, P., Federico, A., Roncari, L., Smania, N., Zanette, G., & Tamburin, S. (2016). Pathophysiology of Motor Dysfunction in Parkinson's Disease as the Rationale for Drug Treatment and Rehabilitation. *Parkinson's Disease*, *2016*, 1-18. https://doi.org/10.1155/2016/9832839

Maia, T. V., & Conceição, V. A. (2018). Dopaminergic Disturbances in Tourette Syndrome: An Integrative Account. *Biological Psychiatry*, *84*(5), 332-344. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.02.1172

Malo, N., Hanley, J. A., Cerquozzi, S., Pelletier, J., & Nadon, R. (2006). Statistical practice in high-throughput screening data analysis. *Nature Biotechnology*, *24*(2), 167-175. https://doi.org/10.1038/nbt1186

Mandai, M., Watanabe, A., Kurimoto, Y., Hirami, Y., Morinaga, C., Daimon, T., Fujihara, M., Akimaru, H., Sakai, N., Shibata, Y., Terada, M., Nomiya, Y., Tanishima, S., Nakamura, M., Kamao, H., Sugita, S., Onishi, A., Ito, T., Fujita, K., … Takahashi, M. (2017). Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *The New England Journal of Medicine*, *376*(11), 1038-1046. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1608368

Marie, S., Heron, B., Bitoun, P., Timmerman, T., Van Den Berghe, G., & Vincent, M.-F. (2004). AICA-ribosiduria: A novel, neurologically devastating inborn error of purine biosynthesis caused by mutation of ATIC. *American Journal of Human Genetics*, *74*(6), 1276-1281. https://doi.org/10.1086/421475

Marín, F., Herrero, M.-T., Vyas, S., & Puelles, L. (2005). Ontogeny of tyrosine hydroxylase mRNA

expression in mid- and forebrain: Neuromeric pattern and novel positive regions. *Developmental Dynamics*, *234*(3), 709-717. https://doi.org/10.1002/dvdy.20467

Marinangeli, C., Didier, S., & Vingtdeux, V. (2016). AMPK in Neurodegenerative Diseases: Implications and Therapeutic Perspectives. *Current Drug Targets*, *17*(8), 890-907. https://doi.org/10.2174/1389450117666160201105645

Maroof, A. M., Keros, S., Tyson, J. A., Ying, S.-W., Ganat, Y. M., Merkle, F. T., Liu, B., Goulburn, A., Stanley, E. G., Elefanty, A. G., Widmer, H. R., Eggan, K., Goldstein, P. A., Anderson, S. A., & Studer, L. (2013). Directed differentiation and functional maturation of cortical interneurons from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, *12*(5), 559-572. https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.04.008

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*, *78*(12), 7634-7638. https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7634

Martin, G. R., & Evans, M. J. (1975). Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: Formation of embryoid bodies in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *72*(4), 1441-1445. https://doi.org/10.1073/pnas.72.4.1441

Marton, R. M., & Ioannidis, J. P. A. (2019). A Comprehensive Analysis of Protocols for Deriving Dopaminergic Neurons from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Translational Medicine*, *8*(4), 366-374. https://doi.org/10.1002/sctm.18-0088

Marton, R. M., & Pașca, S. P. (2020). Organoid and Assembloid Technologies for Investigating Cellular Crosstalk in Human Brain Development and Disease. *Trends in Cell Biology*, *30*(2), 133-143. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.11.004

Mastrangelo, L., Kim, J.-E., Miyanohara, A., Kang, T. H., & Friedmann, T. (2012). Purinergic signaling in human pluripotent stem cells is regulated by the housekeeping gene encoding hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(9), 3377-3382. https://doi.org/10.1073/pnas.1118067109

Mateizel, I., De Temmerman, N., Ullmann, U., Cauffman, G., Sermon, K., Van de Velde, H., De Rycke, M., Degreef, E., Devroey, P., Liebaers, I., & Van Steirteghem, A. (2006). Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Human Reproduction*, *21*(2), 503-511. https://doi.org/10.1093/humrep/dei345

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. *Nature Biotechnology*, *33*(1), 89-96. https://doi.org/10.1038/nbt.3049

McMahon, J. A., Takada, S., Zimmerman, L. B., Fan, C.-M., Harland, R. M., & McMahon, A. P. (1998). Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes & Development*, *12*(10), 1438-1452. https://doi.org/10.1101/gad.12.10.1438

McRitchie, D. A., Hardman, C. D., & Halliday, G. M. (1996). Cytoarchitectural distribution of calcium binding proteins in midbrain dopaminergic regions of rats and humans. *The Journal of Comparative Neurology*, *364*(1), 121-150. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19960101)364:1<121::AID-CNE11>3.0.CO;2-1

Meek, S., Thomson, A. J., Sutherland, L., Sharp, M. G. F., Thomson, J., Bishop, V., Meddle, S. L., Gloaguen, Y., Weidt, S., Singh-Dolt, K., Buehr, M., Brown, H. K., Gill, A. C., & Burdon, T. (2016). Reduced levels of dopamine and altered metabolism in brains of HPRT knock-out rats: A new rodent model of Lesch-Nyhan Disease. *Scientific Reports*, *6*, 25592. https://doi.org/10.1038/srep25592

Mehat, M. S., Sundaram, V., Ripamonti, C., Robson, A. G., Smith, A. J., Borooah, S., Robinson, M., Rosenthal, A. N., Innes, W., Weleber, R. G., Lee, R. W. J., Crossland, M., Rubin, G. S., Dhillon, B., Steel, D. H. W., Anglade, E., Lanza, R. P., Ali, R. R., Michaelides, M., & Bainbridge, J. W. B. (2018). Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells in Macular Degeneration. *Ophthalmology*, *125*(11), 1765-1775. https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2018.04.037

Meiser, J., Weindl, D., & Hiller, K. (2013). Complexity of dopamine metabolism. *Cell Communication and Signaling: CCS*, *11*(1), 34. https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-34

Mendez, I., Sanchez-Pernaute, R., Cooper, O., Viñuela, A., Ferrari, D., Björklund, L., Dagher, A., & Isacson, O. (2005). Cell type analysis of functional fetal dopamine cell suspension transplants in the striatum and substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Brain: A Journal of Neurology*, *128*(Pt 7), 1498-1510. https://doi.org/10.1093/brain/awh510

Merkle, F. T., Ghosh, S., Kamitaki, N., Mitchell, J., Avior, Y., Mello, C., Kashin, S., Mekhoubad, S., Ilic, D., Charlton, M., Saphier, G., Handsaker, R. E., Genovese, G., Bar, S., Benvenisty, N., McCarroll, S. A., & Eggan, K. (2017). Human pluripotent stem cells recurrently acquire and expand dominant negative P53 mutations. *Nature*, *545*(7653), 229-233. https://doi.org/10.1038/nature22312

Mesman, S., & Smidt, M. P. (2020). Acquisition of the Midbrain Dopaminergic Neuronal Identity. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(13), 4638. https://doi.org/10.3390/ijms21134638

Mishra, A., Singh, S., & Shukla, S. (2018). Physiological and Functional Basis of Dopamine Receptors and Their Role in Neurogenesis: Possible Implication for Parkinson's disease. *Journal of Experimental Neuroscience*, *12*, 117906951877982. https://doi.org/10.1177/1179069518779829

Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., & Caron, M. G. (1998). Dopamine receptors: From structure to function. *Physiological Reviews*, *78*(1), 189-225. https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.1.189

Momosaki, K., Kido, J., Matsumoto, S., Taniguchi, A., Akiyama, T., Sawada, T., Ozasa, S., & Nakamura, K. (2019). The Effect of S-Adenosylmethionine Treatment on Neurobehavioral Phenotypes in Lesch-Nyhan Disease: A Case Report. *Case Reports in Neurology*, *11*(3), 256-264. https://doi.org/10.1159/000502568

Montagu, K. A. (1957). Catechol Compounds in Rat Tissues and in Brains of Different Animals. *Nature*, *180*(4579), 244-245. https://doi.org/10.1038/180244a0

Moradi, S., Mahdizadeh, H., Šarić, T., Kim, J., Harati, J., Shahsavarani, H., Greber, B., & Moore, J. B. (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

Muffat, J., Li, Y., Yuan, B., Mitalipova, M., Omer, A., Corcoran, S., Bakiasi, G., Tsai, L.-H., Aubourg, P., Ransohoff, R. M., & Jaenisch, R. (2016). Efficient derivation of microglia-like cells from human pluripotent stem cells. *Nature medicine*, *22*(11), 1358-1367. https://doi.org/10.1038/nm.4189

Myöhänen, T. T., Schendzielorz, N., & Männistö, P. T. (2010). Distribution of catechol-O-methyltransferase (COMT) proteins and enzymatic activities in wild-type and soluble COMT deficient mice: Distribution of MB-COMT in mouse brain and peripheral tissues. *Journal of Neurochemistry*, no-no. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06723.x

Nelander, J., Hebsgaard, J. B., & Parmar, M. (2009). Organization of the human embryonic ventral mesencephalon. *Gene Expression Patterns: GEP*, *9*(8), 555-561. https://doi.org/10.1016/j.gep.2009.10.002

Neychev, V. K., & Jinnah, H. A. (2006). Sudden death in Lesch-Nyhan disease. *Developmental Medicine*

and Child Neurology, *48*(11), 923-926. https://doi.org/10.1017/S0012162206002015

Nickels, S. L., Modamio, J., Mendes-Pinheiro, B., Monzel, A. S., Betsou, F., & Schwamborn, J. C. (2020). Reproducible generation of human midbrain organoids for in vitro modeling of Parkinson's disease. *Stem Cell Research*, *46*, 101870. https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.101870

Niederkofler, V., Asher, T. E., & Dymecki, S. M. (2015). Functional Interplay between Dopaminergic and Serotonergic Neuronal Systems during Development and Adulthood. *ACS Chemical Neuroscience*, *6*(7), 1055-1070. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.5b00021

Nikolaus, S., Antke, C., & Müller, H.-W. (2009). In vivo imaging of synaptic function in the central nervous system: II. Mental and affective disorders. *Behavioural Brain Research*, *204*(1), 32-66. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.06.009

Nikolaus, S., Mamlins, E., Antke, C., Dabir, M., Müller, H.-W., & Giesel, F. L. (2022). Boosted dopamine and blunted serotonin in Tourette syndrome—Evidence from in vivo imaging studies. *Reviews in the Neurosciences*, *33*(8), 859-876. https://doi.org/10.1515/revneuro-2022-0035

Nolbrant, S., Heuer, A., Parmar, M., & Kirkeby, A. (2017). Generation of high-purity human ventral midbrain dopaminergic progenitors for in vitro maturation and intracerebral transplantation. *Nature Protocols*, *12*(9), 1962-1979. https://doi.org/10.1038/nprot.2017.078

Nouri, N., Patel, M. J., Joksimovic, M., Poulin, J.-F., Anderegg, A., Taketo, M. M., Ma, Y.-C., & Awatramani, R. (2015). Excessive Wnt/beta-catenin signaling promotes midbrain floor plate neurogenesis, but results in vacillating dopamine progenitors. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *68*, 131-142. https://doi.org/10.1016/j.mcn.2015.07.002

Okamura, N., Villemagne, V. L., Drago, J., Pejoska, S., Dhamija, R. K., Mulligan, R. S., Ellis, J. R., Ackermann, U., O'Keefe, G., Jones, G., Kung, H. F., Pontecorvo, M. J., Skovronsky, D., & Rowe, C. C. (2010). In vivo measurement of vesicular monoamine transporter type 2 density in Parkinson disease with (18)F-AV-133. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, *51*(2), 223-228. https://doi.org/10.2967/jnumed.109.070094

Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Hong, H., Nakagawa, M., Tanabe, K., Tezuka, K., Shibata, T., Kunisada, T., Takahashi, M., Takahashi, J., Saji, H., & Yamanaka, S. (2011). A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nature Methods*, *8*(5), 409-412. https://doi.org/10.1038/nmeth.1591

Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science (New York, N.Y.)*, *322*(5903), 949-953. https://doi.org/10.1126/science.1164270

Oliveira, Á., Illes, P., & Ulrich, H. (2016). Purinergic receptors in embryonic and adult neurogenesis. *Neuropharmacology*, *104*, 272-281. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.008

Owen, M. J., Sawa, A., & Mortensen, P. B. (2016). Schizophrenia. *Lancet (London, England)*, *388*(10039), 86-97. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01121-6

Page, T., Bakay, B., Nissinen, E., & Nyhan, W. L. (1981). Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase variants: Correlation of clinical phenotype with enzyme activity. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *4*(1), 203-206. https://doi.org/10.1007/BF02263652

Pai, G. S., Sprenkle, J. A., Do, T. T., Mareni, C. E., & Migeon, B. R. (1980). Localization of loci for hypoxanthine phosphoribosyltransferase and glucose-6-phosphate dehydrogenase and biochemical evidence of nonrandom X chromosome expression from studies of a human X-autosome translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *77*(5), 2810-2813. https://doi.org/10.1073/pnas.77.5.2810

Pakkenberg, B., Møller, A., Gundersen, H. J., Mouritzen Dam, A., & Pakkenberg, H. (1991). The absolute

number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *54*(1), 30-33. https://doi.org/10.1136/jnnp.54.1.30

Pal, R., Mamidi, M. K., Das, A. K., & Bhonde, R. (2012). Diverse effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the differentiation potential of human embryonic stem cells. *Archives of Toxicology*, *86*(4), 651-661. https://doi.org/10.1007/s00204-011-0782-2

Panman, L., Papathanou, M., Laguna, A., Oosterveen, T., Volakakis, N., Acampora, D., Kurtsdotter, I., Yoshitake, T., Kehr, J., Joodmardi, E., Muhr, J., Simeone, A., Ericson, J., & Perlmann, T. (2014). Sox6 and Otx2 control the specification of substantia nigra and ventral tegmental area dopamine neurons. *Cell Reports*, *8*(4), 1018-1025. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.016

Park, I.-H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M. W., Cowan, C., Hochedlinger, K., & Daley, G. Q. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, *134*(5), 877-886. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.041

Parmar, M., Grealish, S., & Henchcliffe, C. (2020). The future of stem cell therapies for Parkinson disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, *21*(2), 103-115. https://doi.org/10.1038/s41583-019-0257-7

Pavăl, D. (2017). A Dopamine Hypothesis of Autism Spectrum Disorder. *Developmental Neuroscience*, *39*(5), 355-360. https://doi.org/10.1159/000478725

Pedata, F., Dettori, I., Coppi, E., Melani, A., Fusco, I., Corradetti, R., & Pugliese, A. M. (2016). Purinergic signalling in brain ischemia. *Neuropharmacology*, *104*, 105-130. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.11.007

Peng, C., Aron, L., Klein, R., Li, M., Wurst, W., Prakash, N., & Le, W. (2011). Pitx3 is a critical mediator of GDNF-induced BDNF expression in nigrostriatal dopaminergic neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *31*(36), 12802-12815. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0898-11.2011

Pereira Luppi, M., Azcorra, M., Caronia-Brown, G., Poulin, J.-F., Gaertner, Z., Gatica, S., Moreno-Ramos, O. A., Nouri, N., Dubois, M., Ma, Y. C., Ramakrishnan, C., Fenno, L., Kim, Y. S., Deisseroth, K., Cicchetti, F., Dombeck, D. A., & Awatramani, R. (2021). Sox6 expression distinguishes dorsally and ventrally biased dopamine neurons in the substantia nigra with distinctive properties and embryonic origins. *Cell Reports*, *37*(6), 109975. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109975

Peschanski, M., Defer, G., N'Guyen, J. P., Ricolfi, F., Monfort, J. C., Remy, P., Geny, C., Samson, Y., Hantraye, P., & Jeny, R. (1994). Bilateral motor improvement and alteration of L-dopa effect in two patients with Parkinson's disease following intrastriatal transplantation of foetal ventral mesencephalon. *Brain: A Journal of Neurology*, *117 (Pt 3)*, 487-499. https://doi.org/10.1093/brain/117.3.487

Peter, D., Liu, Y., Sternini, C., de Giorgio, R., Brecha, N., & Edwards, R. (1995). Differential expression of two vesicular monoamine transporters. *The Journal of Neuroscience*, *15*(9), 6179-6188. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-09-06179.1995

Pickering, S. J., Minger, S. L., Patel, M., Taylor, H., Black, C., Burns, C. J., Ekonomou, A., & Braude, P. R. (2005). Generation of a human embryonic stem cell line encoding the cystic fibrosis mutation deltaF508, using preimplantation genetic diagnosis. *Reproductive Biomedicine Online*, *10*(3), 390-397. https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61801-9

Poulin, J.-F., Gaertner, Z., Moreno-Ramos, O. A., & Awatramani, R. (2020). Classification of Midbrain Dopamine Neurons Using Single-Cell Gene Expression Profiling Approaches. *Trends in Neurosciences*, *43*(3), 155-169. https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.01.004

Poulin, J.-F., Zou, J., Drouin-Ouellet, J., Kim, K.-Y. A., Cicchetti, F., & Awatramani, R. B. (2014). Defining Midbrain Dopaminergic Neuron Diversity by Single-Cell Gene Expression Profiling. *Cell Reports*,

9(3), 930-943. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.10.008

Prakash, N. (2006). A Wnt1-regulated genetic network controls the identity and fate of midbrain-dopaminergic progenitors in vivo. *Development*, *133*(1), 89-98. https://doi.org/10.1242/dev.02181

Prakash, N. (2022). Developmental pathways linked to the vulnerability of adult midbrain dopaminergic neurons to neurodegeneration. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *15*, 1071731. https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.1071731

Prakash, N., Puelles, E., Freude, K., Trümbach, D., Omodei, D., Di Salvio, M., Sussel, L., Ericson, J., Sander, M., Simeone, A., & Wurst, W. (2009). Nkx6-1 controls the identity and fate of red nucleus and oculomotor neurons in the mouse midbrain. *Development*, *136*(15), 2545-2555. https://doi.org/10.1242/dev.031781

Prakash, N., & Wurst, W. (2004). Specification of midbrain territory. *Cell and Tissue Research*, *318*(1), 5-14. https://doi.org/10.1007/s00441-004-0955-x

Prakash, N., & Wurst, W. (2006). Development of dopaminergic neurons in the mammalian brain. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *63*(2), 187-206. https://doi.org/10.1007/s00018-005-5387-6

Puelles, E., Annino, A., Tuorto, F., Usiello, A., Acampora, D., Czerny, T., Brodski, C., Ang, S.-L., Wurst, W., & Simeone, A. (2004). Otx2 regulates the extent, identity and fate of neuronal progenitor domains in the ventral midbrain. *Development (Cambridge, England)*, *131*(9), 2037-2048. https://doi.org/10.1242/dev.01107

Qi, Y., Zhang, X.-J., Renier, N., Wu, Z., Atkin, T., Sun, Z., Ozair, M. Z., Tchieu, J., Zimmer, B., Fattahi, F., Ganat, Y., Azevedo, R., Zeltner, N., Brivanlou, A. H., Karayiorgou, M., Gogos, J., Tomishima, M., Tessier-Lavigne, M., Shi, S.-H., & Studer, L. (2017). Combined small-molecule inhibition accelerates the derivation of functional cortical neurons from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, *35*(2), 154-163. https://doi.org/10.1038/nbt.3777

Rajamani, U., Gross, A. R., Hjelm, B. E., Sequeira, A., Vawter, M. P., Tang, J., Gangalapudi, V., Wang, Y., Andres, A. M., Gottlieb, R. A., & Sareen, D. (2018). Super-Obese Patient-Derived iPSC Hypothalamic Neurons Exhibit Obesogenic Signatures and Hormone Responses. *Cell Stem Cell*, *22*(5), 698-712.e9. https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.03.009

Ramond, F., Rio, M., Héron, B., Imbard, A., Marie, S., Billiemaz, K., Denommé-Pichon, A., Kuentz, P., Ceballos, I., Piraud, M., Vincent, M., & Touraine, R. (2020). AICA -ribosiduria due to ATIC deficiency: Delineation of the phenotype with three novel cases, and long-term update on the first case. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *43*(6), 1254-1264. https://doi.org/10.1002/jimd.12274

Rassin, D. K., Lloyd, K. G., Kelley, W. N., & Fox, I. (1982). Decreased amino acids in various brain areas of patients with Lesch-Nyhan syndrome. *Neuropediatrics*, *13*(3), 130-134. https://doi.org/10.1055/s-2008-1059611

Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A., & Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: Somatic differentiation in vitro. *Nature Biotechnology*, *18*(4), 399-404. https://doi.org/10.1038/74447

Reyes, S., Fu, Y., Double, K., Thompson, L., Kirik, D., Paxinos, G., & Halliday, G. M. (2012). GIRK2 expression in dopamine neurons of the substantia nigra and ventral tegmental area. *The Journal of Comparative Neurology*, *520*(12), 2591-2607. https://doi.org/10.1002/cne.23051

Rice, M. W., Roberts, R. C., Melendez-Ferro, M., & Perez-Costas, E. (2016). Mapping dopaminergic deficiencies in the substantia nigra/ventral tegmental area in schizophrenia. *Brain Structure & Function*, *221*(1), 185-201. https://doi.org/10.1007/s00429-014-0901-y

Richards, M., Fong, C.-Y., Chan, W.-K., Wong, P.-C., & Bongso, A. (2002). Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, *20*(9), 933-936. https://doi.org/10.1038/nbt726

Rivera, T., Zhao, Y., Ni, Y., & Wang, J. (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

Ruillier, V., Tournois, J., Boissart, C., Lasbareilles, M., Mahé, G., Chatrousse, L., Cailleret, M., Peschanski, M., & Benchoua, A. (2020). Rescuing compounds for Lesch-Nyhan disease identified using stem cell–based phenotypic screening. *JCI Insight*, *5*(4), e132094. https://doi.org/10.1172/jci.insight.132094

Saito, Y., Ito, M., Hanaoka, S., Ohama, E., Akaboshi, S., & Takashima, S. (1999). Dopamine receptor upregulation in Lesch-Nyhan syndrome: A postmortem study. *Neuropediatrics*, *30*(2), 66-71. https://doi.org/10.1055/s-2007-973462

Saito, Y., & Takashima, S. (2000). Neurotransmitter changes in the pathophysiology of Lesch–Nyhan syndrome. *Brain and Development*, *22*, 122-131. https://doi.org/10.1016/S0387-7604(00)00143-1

Sakrikar, D., Mazei-Robison, M. S., Mergy, M. A., Richtand, N. W., Han, Q., Hamilton, P. J., Bowton, E., Galli, A., Veenstra-Vanderweele, J., Gill, M., & Blakely, R. D. (2012). Attention deficit/hyperactivity disorder-derived coding variation in the dopamine transporter disrupts microdomain targeting and trafficking regulation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *32*(16), 5385-5397. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6033-11.2012

Sarkar, A., Mei, A., Paquola, A. C. M., Stern, S., Bardy, C., Klug, J. R., Kim, S., Neshat, N., Kim, H. J., Ku, M., Shokhirev, M. N., Adamowicz, D. H., Marchetto, M. C., Jappelli, R., Erwin, J. A., Padmanabhan, K., Shtrahman, M., Jin, X., & Gage, F. H. (2018). Efficient Generation of CA3 Neurons from Human Pluripotent Stem Cells Enables Modeling of Hippocampal Connectivity In Vitro. *Cell Stem Cell*, *22*(5), 684-697.e9. https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.04.009

Schmidt, S. G., Malle, M. G., Nielsen, A. K., Bohr, S. S.-R., Pugh, C. F., Nielsen, J. C., Poulsen, I. H., Rand, K. D., Hatzakis, N. S., & Loland, C. J. (2022). The dopamine transporter antiports potassium to increase the uptake of dopamine. *Nature Communications*, *13*(1), 2446. https://doi.org/10.1038/s41467-022-30154-5

Schoenwolf, G. C., & Smith, J. L. (2000). Mechanisms of neurulation. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *136*, 125-134. https://doi.org/10.1385/1-59259-065-9:125

Schott, B. H., Frischknecht, R., Debska-Vielhaber, G., John, N., Behnisch, G., Düzel, E., Gundelfinger, E. D., & Seidenbecher, C. I. (2010). Membrane-Bound Catechol-O-Methyl Transferase in Cortical Neurons and Glial Cells is Intracellularly Oriented. *Frontiers in Psychiatry*, *1*. https://doi.org/10.3389/fpsyt.2010.00142

Schretlen, D. J., Harris, J. C., Park, K. S., Jinnah, H. A., & Del Pozo, N. O. (2001). Neurocognitive functioning in Lesch-Nyhan disease and partial hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency. *Journal of the International Neuropsychological Society*, *7*(7), 805-812. https://doi.org/10.1017/S135561770177703X

Schretlen, D. J., Ward, J., Meyer, S. M., Yun, J., Puig, J. G., Nyhan, W. L., Jinnah, H., & Harris, J. C. (2005). Behavioral aspects of Lesch–Nyhan disease and its variants. *Developmental Medicine and Child Neurology*, *47*(10), 673. https://doi.org/10.1017/S0012162205001374

Schütz, B., Schäfer, M. K.-H., Eiden, L. E., & Weihe, E. (1998). Vesicular amine transporter expression and isoform selection in developing brain, peripheral nervous system and gut. *Developmental Brain*

Research, *106*(1-2), 181-204. https://doi.org/10.1016/S0165-3806(97)00196-X

Seeman, P. (2013). Schizophrenia and dopamine receptors. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, *23*(9), 999-1009. https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2013.06.005

Serrano, M., Pérez-Dueñas, B., Ormazábal, A., Artuch, R., Campistol, J., Torres, R. J., & García-Cazorla, A. (2008). Levodopa therapy in a Lesch-Nyhan disease patient: Pathological, biochemical, neuroimaging, and therapeutic remarks. *Movement Disorders*, *23*(9), 1297-1300. https://doi.org/10.1002/mds.21786

Shcheglovitov, A., Shcheglovitova, O., Yazawa, M., Portmann, T., Shu, R., Sebastiano, V., Krawisz, A., Froehlich, W., Bernstein, J. A., Hallmayer, J. F., & Dolmetsch, R. E. (2013). SHANK3 and IGF1 restore synaptic deficits in neurons from 22q13 deletion syndrome patients. *Nature*, *503*(7475), 267-271. https://doi.org/10.1038/nature12618

Shen, L.-H., Liao, M.-H., & Tseng, Y.-C. (2012). Recent Advances in Imaging of Dopaminergic Neurons for Evaluation of Neuropsychiatric Disorders. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2012*, 1-14. https://doi.org/10.1155/2012/259349

Shirley, T. L., Lewers, J. C., Egami, K., Majumdar, A., Kelly, M., Ceballos-Picot, I., Seidman, M. M., & Jinnah, H. A. (2007). A human neuronal tissue culture model for Lesch-Nyhan disease. *Journal of Neurochemistry*, *101*(3), 841-853. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04472.x

Sidi, Y., & Mitchell, B. S. (1985). Z-nucleotide accumulation in erythrocytes from Lesch-Nyhan patients. *Journal of Clinical Investigation*, *76*(6), 2416-2419. https://doi.org/10.1172/JCI112255

Silva, M. C., & Haggarty, S. J. (2020). Human pluripotent stem cell-derived models and drug screening in CNS precision medicine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1471*(1), 18-56. https://doi.org/10.1111/nyas.14012

Silverstein, F. S., Johnston, M. V., Hutchinson, R. J., & Edwards, N. L. (1985). Lesch-Nyhan syndrome: CSF neurotransmitter abnormalities. *Neurology*, *35*(6), 907-907. https://doi.org/10.1212/WNL.35.6.907

Simeone, A., Di Salvio, M., Di Giovannantonio, L. G., Acampora, D., Omodei, D., & Tomasetti, C. (2011). The Role of Otx2 in Adult Mesencephalic–Diencephalic Dopaminergic Neurons. *Molecular Neurobiology*, *43*(2), 107-113. https://doi.org/10.1007/s12035-010-8148-y

Simon, H. H., Saueressig, H., Wurst, W., Goulding, M. D., & O'Leary, D. D. M. (2001). Fate of Midbrain Dopaminergic Neurons Controlled by the Engrailed Genes. *The Journal of Neuroscience*, *21*(9), 3126-3134. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-09-03126.2001

Simonyan, K., Cho, H., Hamzehei Sichani, A., Rubien-Thomas, E., & Hallett, M. (2017). The direct basal ganglia pathway is hyperfunctional in focal dystonia. *Brain: A Journal of Neurology*, *140*(12), 3179-3190. https://doi.org/10.1093/brain/awx263

Sleiman, P. M. A., Healy, D. G., Muqit, M. M. K., Yang, Y. X., Van Der Brug, M., Holton, J. L., Revesz, T., Quinn, N. P., Bhatia, K., Diss, J. K. J., Lees, A. J., Cookson, M. R., Latchman, D. S., & Wood, N. W. (2009). Characterisation of a novel NR4A2 mutation in Parkinson's disease brain. *Neuroscience Letters*, *457*(2), 75-79. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.03.021

Smidt, M. P., Asbreuk, C. H., Cox, J. J., Chen, H., Johnson, R. L., & Burbach, J. P. (2000). A second independent pathway for development of mesencephalic dopaminergic neurons requires Lmx1b. *Nature Neuroscience*, *3*(4), 337-341. https://doi.org/10.1038/73902

Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M., & Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, *336*(6200), 688-690. https://doi.org/10.1038/336688a0

Smits, S. M., & Smidt, M. P. (2006). The role of Pitx3 in survival of midbrain dopaminergic neurons. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, *70*, 57-60. https://doi.org/10.1007/978-3-211-45295-0_10

Soleilhavoup, C., Travaglio, M., Patrick, K., Garção, P., Boobalan, E., Adolfs, Y., Spriggs, R. V., Moles-Garcia, E., Dhiraj, D., Oosterveen, T., Ferri, S. L., Abel, T., Brodkin, E. S., Pasterkamp, R. J., Brooks, B. P., & Panman, L. (2020). Nolz1 expression is required in dopaminergic axon guidance and striatal innervation. *Nature Communications*, *11*(1), 3111. https://doi.org/10.1038/s41467-020-16947-6

Spencer, D. D., Robbins, R. J., Naftolin, F., Marek, K. L., Vollmer, T., Leranth, C., Roth, R. H., Price, L. H., Gjedde, A., & Bunney, B. S. (1992). Unilateral transplantation of human fetal mesencephalic tissue into the caudate nucleus of patients with Parkinson's disease. *The New England Journal of Medicine*, *327*(22), 1541-1548. https://doi.org/10.1056/NEJM199211263272201

Stark, A. J., Smith, C. T., Petersen, K. J., Trujillo, P., van Wouwe, N. C., Donahue, M. J., Kessler, R. M., Deutch, A. Y., Zald, D. H., & Claassen, D. O. (2018). [18F]fallypride characterization of striatal and extrastriatal D2/3 receptors in Parkinson's disease. *NeuroImage: Clinical*, *18*, 433-442. https://doi.org/10.1016/j.nicl.2018.02.010

Steeg, R., Mueller, S. C., Mah, N., Holst, B., Cabrera-Socorro, A., Stacey, G. N., De Sousa, P. A., Courtney, A., & Zimmermann, H. (2021). EBiSC best practice: How to ensure optimal generation, qualification, and distribution of iPSC lines. *Stem Cell Reports*, *16*(8), 1853-1867. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.07.009

Steichen, C., Hannoun, Z., Luce, E., Hauet, T., & Dubart-Kupperschmitt, A. (2019). Genomic integrity of human induced pluripotent stem cells: Reprogramming, differentiation and applications. *World Journal of Stem Cells*, *11*(10), 729-747. https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i10.729

Steinbeck, J. A., Choi, S. J., Mrejeru, A., Ganat, Y., Deisseroth, K., Sulzer, D., Mosharov, E. V., & Studer, L. (2015). Optogenetics enables functional analysis of human embryonic stem cell-derived grafts in a Parkinson's disease model. *Nature Biotechnology*, *33*(2), 204-209. https://doi.org/10.1038/nbt.3124

Stout, J. T., & Caskey, C. T. (1985). HPRT: Gene structure, expression, and mutation. *Annual Review of Genetics*, *19*, 127-148. https://doi.org/10.1146/annurev.ge.19.120185.001015

Sullivan, S., Stacey, G. N., Akazawa, C., Aoyama, N., Baptista, R., Bedford, P., Bennaceur Griscelli, A., Chandra, A., Elwood, N., Girard, M., Kawamata, S., Hanatani, T., Latsis, T., Lin, S., Ludwig, T. E., Malygina, T., Mack, A., Mountford, J. C., Noggle, S., … Song, J. (2018). Quality control guidelines for clinical-grade human induced pluripotent stem cell lines. *Regenerative Medicine*, *13*(7), 859-866. https://doi.org/10.2217/rme-2018-0095

Sun, A. X., Yuan, Q., Tan, S., Xiao, Y., Wang, D., Khoo, A. T. T., Sani, L., Tran, H.-D., Kim, P., Chiew, Y. S., Lee, K. J., Yen, Y.-C., Ng, H. H., Lim, B., & Je, H. S. (2016). Direct Induction and Functional Maturation of Forebrain GABAergic Neurons from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Reports*, *16*(7), 1942-1953. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.035

Sutcliffe, D. J., Dinasarapu, A. R., Visser, J. E., Hoed, J. den, Seifar, F., Joshi, P., Ceballos-Picot, I., Sardar, T., Hess, E. J., Sun, Y. V., Wen, Z., Zwick, M. E., & Jinnah, H. A. (2021). Induced pluripotent stem cells from subjects with Lesch-Nyhan disease. *Scientific Reports*, *11*(1), 8523. https://doi.org/10.1038/s41598-021-87955-9

Svenningsson, P., Nishi, A., Fisone, G., Girault, J.-A., Nairn, A. C., & Greengard, P. (2004). DARPP-32: An Integrator of Neurotransmission. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *44*(1), 269-296. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121415

Tabansky, I., & Stern, J. N. H. (2016). Basics of Stem Cell Biology as Applied to the Brain. In D. Pfaff & Y.

Christen (Éds.), *Stem Cells in Neuroendocrinology* (p. 11-24). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41603-8_2

Takahashi, J. (2017). Strategies for bringing stem cell-derived dopamine neurons to the clinic : The Kyoto trial. *Progress in Brain Research*, *230*, 213-226. https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2016.11.004

Takahashi, J. (2020). iPS cell-based therapy for Parkinson's disease : A Kyoto trial. *Regenerative Therapy*, *13*, 18-22. https://doi.org/10.1016/j.reth.2020.06.002

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*(5), 861-872. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, *126*(4), 663-676. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024

Tang, M., Luo, S. X., Tang, V., & Huang, E. J. (2013). Temporal and spatial requirements of Smoothened in ventral midbrain neuronal development. *Neural Development*, *8*, 8. https://doi.org/10.1186/1749-8104-8-8

Tannenbaum, S. E., Tako Turetsky, T., Singer, O., Aizenman, E., Kirshberg, S., Ilouz, N., Gil, Y., Berman-Zaken, Y., Perlman, T. S., Geva, N., Levy, O., Arbell, D., Simon, A., Ben-Meir, A., Shufaro, Y., Laufer, N., & Reubinoff, B. E. (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

Tariot, P. N., Ballard, C., Devanand, D. P., Cummings, J. L., & Sultzer, D. L. (2022). Pimavanserin and dementia-related psychosis. *The Lancet Neurology*, *21*(2), 114-115. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00466-X

Taylor, C. J., Peacock, S., Chaudhry, A. N., Bradley, J. A., & Bolton, E. M. (2012). Generating an iPSC bank for HLA-matched tissue transplantation based on known donor and recipient HLA types. *Cell Stem Cell*, *11*(2), 147-152. https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.07.014

Theka, I., Caiazzo, M., Dvoretskova, E., Leo, D., Ungaro, F., Curreli, S., Managò, F., Dell'Anno, M. T., Pezzoli, G., Gainetdinov, R. R., Dityatev, A., & Broccoli, V. (2013). Rapid generation of functional dopaminergic neurons from human induced pluripotent stem cells through a single-step procedure using cell lineage transcription factors. *Stem Cells Translational Medicine*, *2*(6), 473-479. https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0133

Thompson, L., Barraud, P., Andersson, E., Kirik, D., & Björklund, A. (2005). Identification of dopaminergic neurons of nigral and ventral tegmental area subtypes in grafts of fetal ventral mesencephalon based on cell morphology, protein expression, and efferent projections. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *25*(27), 6467-6477. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1676-05.2005

Thompson, L. H., Andersson, E., Jensen, J. B., Barraud, P., Guillemot, F., Parmar, M., & Björklund, A. (2006). Neurogenin2 identifies a transplantable dopamine neuron precursor in the developing ventral mesencephalon. *Experimental Neurology*, *198*(1), 183-198. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2005.11.025

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*, *282*(5391), 1145-1147. https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145

Tiklová, K., Björklund, Å. K., Lahti, L., Fiorenzano, A., Nolbrant, S., Gillberg, L., Volakakis, N., Yokota, C., Hilscher, M. M., Hauling, T., Holmström, F., Joodmardi, E., Nilsson, M., Parmar, M., & Perlmann,

T. (2019). Single-cell RNA sequencing reveals midbrain dopamine neuron diversity emerging during mouse brain development. *Nature Communications*, *10*(1), 581. https://doi.org/10.1038/s41467-019-08453-1

Torres, R. J., Deantonio, I., Prior, C., & Puig, J. G. (2004). Adenosine transport in peripheral blood lymphocytes from Lesch-Nyhan patients. *The Biochemical Journal*, *377*(Pt 3), 733-739. https://doi.org/10.1042/BJ20031035

Torres, R. J., Prior, C., & Puig, J. G. (2007). Efficacy and safety of allopurinol in patients with hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency. *Metabolism: Clinical and Experimental*, *56*(9), 1179-1186. https://doi.org/10.1016/j.metabol.2007.04.013

Torres, R. J., & Puig, J. G. (2007). Hypoxanthine-guanine phosophoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *2*(1), 48. https://doi.org/10.1186/1750-1172-2-48

Torres, R. J., & Puig, J. G. (2015). Hypoxanthine deregulates genes involved in early neuronal development. Implications in Lesch-Nyhan disease pathogenesis. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *38*(6), 1109-1118. https://doi.org/10.1007/s10545-015-9854-4

Townsend, M. H., Robison, R. A., & O'Neill, K. L. (2018). A review of HPRT and its emerging role in cancer. *Medical Oncology*, *35*(6), 89. https://doi.org/10.1007/s12032-018-1144-1

Tschirner, S. K., Gutzki, F., Schneider, E. H., Seifert, R., & Kaever, V. (2016). Neurotransmitter and their metabolite concentrations in different areas of the HPRT knockout mouse brain. *Journal of the Neurological Sciences*, *365*, 169-174. https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.04.025

Tunçer, S., Gurbanov, R., Sheraj, I., Solel, E., Esenturk, O., & Banerjee, S. (2018). Low dose dimethyl sulfoxide driven gross molecular changes have the potential to interfere with various cellular processes. *Scientific Reports*, *8*(1), 14828. https://doi.org/10.1038/s41598-018-33234-z

Urbach, A., Schuldiner, M., & Benvenisty, N. (2004). Modeling for Lesch-Nyhan disease by gene targeting in human embryonic stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *22*(4), 635-641. https://doi.org/10.1634/stemcells.22-4-635

van der Kant, R., Langness, V. F., Herrera, C. M., Williams, D. A., Fong, L. K., Leestemaker, Y., Steenvoorden, E., Rynearson, K. D., Brouwers, J. F., Helms, J. B., Ovaa, H., Giera, M., Wagner, S. L., Bang, A. G., & Goldstein, L. S. B. (2019). Cholesterol Metabolism Is a Druggable Axis that Independently Regulates Tau and Amyloid-β in iPSC-Derived Alzheimer's Disease Neurons. *Cell Stem Cell*, *24*(3), 363-375.e9. https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.12.013

van der Zee, S. P., Lommen, E. J., Trijbels, J. M., & Schretlen, E. D. (1970). The influence of adenine on the clinical features and purine metabolism in the Lesch-Nyhan syndrome. *Acta Paediatrica Scandinavica*, *59*(3), 259-264. https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1970.tb09001.x

Velasco, S., Kedaigle, A. J., Simmons, S. K., Nash, A., Rocha, M., Quadrato, G., Paulsen, B., Nguyen, L., Adiconis, X., Regev, A., Levin, J. Z., & Arlotta, P. (2019). Individual brain organoids reproducibly form cell diversity of the human cerebral cortex. *Nature*, *570*(7762), 523-527. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1289-x

Verheijen, M., Lienhard, M., Schrooders, Y., Clayton, O., Nudischer, R., Boerno, S., Timmermann, B., Selevsek, N., Schlapbach, R., Gmuender, H., Gotta, S., Geraedts, J., Herwig, R., Kleinjans, J., & Caiment, F. (2019). DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Scientific Reports*, *9*(1), 4641. https://doi.org/10.1038/s41598-019-40660-0

Visser, J. E., Bär, P. R., & Jinnah, H. A. (2000). Lesch–Nyhan disease and the basal ganglia. *Brain Research Reviews*, *32*(2-3), 449-475. https://doi.org/10.1016/S0165-0173(99)00094-6

Visser, J. E., Cotton, A. C., Schretlen, D. J., Bloch, J., Tedroff, K., Schechtmann, G., Radu Djurfeldt, D.,

Gonzalez, V., Cif, L., & Jinnah, H. A. (2021). Deep brain stimulation in Lesch-Nyhan disease: Outcomes from the patient's perspective. *Developmental Medicine and Child Neurology*, *63*(8), 963-968. https://doi.org/10.1111/dmcn.14852

Visser, J. E., & Jinnah, H. A. (2020). Purine Metabolism Defects: The Movement Disorder of Lesch–Nyhan Disease. In D. Ebrahimi-Fakhari & P. L. Pearl (Éds.), *Movement Disorders and Inherited Metabolic Disorders: Recognition, Understanding, Improving Outcomes* (p. 327-341). Cambridge University Press. https://www.cambridge.org/core/books/movement-disorders-and-inherited-metabolic-disorders/purine-metabolism-defects-the-movement-disorder-of-leschnyhan-disease/A713B51DB0954CB2976D2AF2C0A5F4C2

Visser, J. E., Schretlen, D. J., Bloem, B. R., & Jinnah, H. A. (2011). Levodopa is not a useful treatment for Lesch-Nyhan disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, *26*(4), 746-749. https://doi.org/10.1002/mds.23478

Volpicelli, F., Caiazzo, M., Greco, D., Consales, C., Leone, L., Perrone-Capano, C., Colucci D'Amato, L., & di Porzio, U. (2007). Bdnf gene is a downstream target of Nurr1 transcription factor in rat midbrain neurons in vitro. *Journal of Neurochemistry*, *102*(2), 441-453. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04494.x

Volpicelli, F., Perrone-Capano, C., Bellenchi, G. C., Colucci-D'Amato, L., & di Porzio, U. (2020). Molecular Regulation in Dopaminergic Neuron Development. Cues to Unveil Molecular Pathogenesis and Pharmacological Targets of Neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(11), 3995. https://doi.org/10.3390/ijms21113995

Wang, C., Najm, R., Xu, Q., Jeong, D.-E., Walker, D., Balestra, M. E., Yoon, S. Y., Yuan, H., Li, G., Miller, Z. A., Miller, B. L., Malloy, M. J., & Huang, Y. (2018). Gain of toxic apolipoprotein E4 effects in human iPSC-derived neurons is ameliorated by a small-molecule structure corrector. *Nature Medicine*, *24*(5), 647-657. https://doi.org/10.1038/s41591-018-0004-z

Wang, C., Ward, M. E., Chen, R., Liu, K., Tracy, T. E., Chen, X., Xie, M., Sohn, P. D., Ludwig, C., Meyer-Franke, A., Karch, C. M., Ding, S., & Gan, L. (2017). Scalable Production of iPSC-Derived Human Neurons to Identify Tau-Lowering Compounds by High-Content Screening. *Stem Cell Reports*, *9*(4), 1221-1233. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.08.019

Wang, M., Ling, K.-H., Tan, J., & Lu, C.-B. (2020). Development and Differentiation of Midbrain Dopaminergic Neuron: From Bench to Bedside. *Cells*, *9*(6), 1489. https://doi.org/10.3390/cells9061489

Wang, S., Bates, J., Li, X., Schanz, S., Chandler-Militello, D., Levine, C., Maherali, N., Studer, L., Hochedlinger, K., Windrem, M., & Goldman, S. A. (2013). Human iPSC-derived oligodendrocyte progenitor cells can myelinate and rescue a mouse model of congenital hypomyelination. *Cell Stem Cell*, *12*(2), 252-264. https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.12.002

Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J. B., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Muguruma, K., & Sasai, Y. (2007). A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, *25*(6), Art. 6. https://doi.org/10.1038/nbt1310

Weihe, E., Schäfer, M. K.-H., Erickson, J. D., & Eiden, L. E. (1994). Localization of vesicular monoamine transporter isoforms (VMAT1 and VMAT2) to endocrine cells and neurons in rat. *Journal of Molecular Neuroscience*, *5*(3), 149-164. https://doi.org/10.1007/BF02736730

Weinstein, J. J., Chohan, M. O., Slifstein, M., Kegeles, L. S., Moore, H., & Abi-Dargham, A. (2017). Pathway-Specific Dopamine Abnormalities in Schizophrenia. *Biological Psychiatry*, *81*(1), 31-42. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.03.2104

Wever, I., Largo-Barrientos, P., Hoekstra, E. J., & Smidt, M. P. (2019). Lmx1b Influences Correct Post-mitotic Coding of Mesodiencephalic Dopaminergic Neurons. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *12*, 62. https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00062

Wexler, E. M., & Geschwind, D. H. (2007). Out FOXing Parkinson disease: Where development meets neurodegeneration. *PLoS Biology*, *5*(12), e334. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050334

Williams, L. A., Davis-Dusenbery, B. N., & Eggan, K. C. (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, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N. A., & Gough, N. M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, *336*(6200), 684-687. https://doi.org/10.1038/336684a0

Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., & Campbell, K. H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, *385*(6619), 810-813. https://doi.org/10.1038/385810a0

Witteveen, J. S., Loopstok, S. R., Ballesteros, L. L., Boonstra, A., van Bakel, N. H. M., van Boekel, W. H. P., Martens, G. J. M., Visser, J. E., & Kolk, S. M. (2022). HGprt deficiency disrupts dopaminergic circuit development in a genetic mouse model of Lesch–Nyhan disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *79*(6), 341. https://doi.org/10.1007/s00018-022-04326-x

Wong, D. F., Brasić, J. R., Singer, H. S., Schretlen, D. J., Kuwabara, H., Zhou, Y., Nandi, A., Maris, M. A., Alexander, M., Ye, W., Rousset, O., Kumar, A., Szabo, Z., Gjedde, A., & Grace, A. A. (2008). Mechanisms of dopaminergic and serotonergic neurotransmission in Tourette syndrome: Clues from an in vivo neurochemistry study with PET. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *33*(6), 1239-1251. https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301528

Wong, D. F., Harris, J. C., Naidu, S., Yokoi, F., Marenco, S., Dannals, R. F., Ravert, H. T., Yaster, M., Evans, A., Rousset, O., Bryan, R. N., Gjedde, A., Kuhar, M. J., & Breese, G. R. (1996). Dopamine transporters are markedly reduced in Lesch-Nyhan disease in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(11), 5539-5543. https://doi.org/10.1073/pnas.93.11.5539

Wu, C. L., & Melton, D. W. (1993). Production of a model for Lesch-Nyhan syndrome in hypoxanthine phosphoribosyltransferase-deficient mice. *Nature Genetics*, *3*(3), 235-240. https://doi.org/10.1038/ng0393-235

Wurst, W., & Bally-Cuif, L. (2001). Neural plate patterning: Upstream and downstream of the isthmic organizer. *Nature Reviews Neuroscience*, *2*(2), 99-108. https://doi.org/10.1038/35053516

Wurst, W., & Prakash, N. (2014). Wnt1-regulated genetic networks in midbrain dopaminergic neuron development. *Journal of Molecular Cell Biology*, *6*(1), 34-41. https://doi.org/10.1093/jmcb/mjt046

Yamaguchi, A., Ishikawa, K.-I., Inoshita, T., Shiba-Fukushima, K., Saiki, S., Hatano, T., Mori, A., Oji, Y., Okuzumi, A., Li, Y., Funayama, M., Imai, Y., Hattori, N., & Akamatsu, W. (2020). Identifying Therapeutic Agents for Amelioration of Mitochondrial Clearance Disorder in Neurons of Familial Parkinson Disease. *Stem Cell Reports*, *14*(6), 1060-1075. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.04.011

Yamanaka, S. (2012). Induced Pluripotent Stem Cells: Past, Present, and Future. *Cell Stem Cell*, *10*(6), 678-684. https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.005

Yamanaka, S. (2020). Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy—Promise and Challenges. *Cell Stem Cell*, *27*(4), 523-531. https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.09.014

Yamanaka, S., & Blau, H. M. (2010). Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches.

Nature, *465*(7299), 704-712. https://doi.org/10.1038/nature09229

Yan, C. H., Levesque, M., Claxton, S., Johnson, R. L., & Ang, S.-L. (2011). Lmx1a and Lmx1b Function Cooperatively to Regulate Proliferation, Specification, and Differentiation of Midbrain Dopaminergic Progenitors. *Journal of Neuroscience*, *31*(35), 12413-12425. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1077-11.2011

Yang, J., Brown, A., Ellisor, D., Paul, E., Hagan, N., & Zervas, M. (2013). Dynamic temporal requirement of *Wnt1* in midbrain dopamine neuron development. *Development*, *140*(6), 1342-1352. https://doi.org/10.1242/dev.080630

Yang, N., Chanda, S., Marro, S., Ng, Y.-H., Janas, J. A., Haag, D., Ang, C. E., Tang, Y., Flores, Q., Mall, M., Wapinski, O., Li, M., Ahlenius, H., Rubenstein, J. L., Chang, H. Y., Buylla, A. A., Südhof, T. C., & Wernig, M. (2017). Generation of pure GABAergic neurons by transcription factor programming. *Nature Methods*, *14*(6), 621-628. https://doi.org/10.1038/nmeth.4291

Ye, J., Bates, N., Soteriou, D., Grady, L., Edmond, C., Ross, A., Kerby, A., Lewis, P. A., Adeniyi, T., Wright, R., Poulton, K. V., Lowe, M., Kimber, S. J., & Brison, D. R. (2017). High quality clinical grade human embryonic stem cell lines derived from fresh discarded embryos. *Stem Cell Research & Therapy*, *8*(1), 128. https://doi.org/10.1186/s13287-017-0561-y

Ye, W., Shimamura, K., Rubenstein, J. L., Hynes, M. A., & Rosenthal, A. (1998). FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell*, *93*(5), 755-766. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81437-3

Yeh, J., Zheng, S., & Howard, B. D. (1998). Impaired differentiation of HPRT-deficient dopaminergic neurons: A possible mechanism underlying neuronal dysfunction in Lesch-Nyhan syndrome. *Journal of Neuroscience Research*, *53*(1), 78-85. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19980701)53:1<78::AID-JNR8>3.0.CO;2-G

Yoshida, J., Oñate, M., Khatami, L., Vera, J., Nadim, F., & Khodakhah, K. (2022). Cerebellar Contributions to the Basal Ganglia Influence Motor Coordination, Reward Processing, and Movement Vigor. *The Journal of Neuroscience*, *42*(45), 8406-8415. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1535-22.2022

Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I., & Thomson, J. A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science (New York, N.Y.)*, *318*(5858), 1917-1920. https://doi.org/10.1126/science.1151526

Zhou, Q. Y., Li, C., Olah, M. E., Johnson, R. A., Stiles, G. L., & Civelli, O. (1992). Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: The A3 adenosine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(16), 7432-7436. https://doi.org/10.1073/pnas.89.16.7432

Zhu, C.-B., Lindler, K. M., Campbell, N. G., Sutcliffe, J. S., Hewlett, W. A., & Blakely, R. D. (2011). Colocalization and regulated physical association of presynaptic serotonin transporters with A_3 adenosine receptors. *Molecular Pharmacology*, *80*(3), 458-465. https://doi.org/10.1124/mol.111.071399

Zoref-Shani, E., Bromberg, Y., Brosh, S., Sidi, Y., & Sperling, O. (1993). Characterization of the alterations in purine nucleotide metabolism in hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase-deficient rat neuroma cell line. *Journal of Neurochemistry*, *61*(2), 457-463. https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb02146.x

université PARIS-SACLAY
ÉCOLE DOCTORALE
Innovation thérapeutique
du fondamental à l'appliqué
(ITFA)

Title: Development of a high-throughput screening assay based on pluripotent stem cells to identify modulators of dopaminergic neurogenesis in humans. Purine-dependent pathways and Lesch-Nyhan disease as proof of principle.

Keywords: Human pluripotent stem cells. Dopaminergic neurons. High-throughput screening. Purinergic pathways. Lesch-Nyhan disease.

Abstract: Dopamine neurons of the central nervous system are mainly located in the ventral midbrain. They are divided into several subgroups projecting to different brain structures, forming the dopaminergic pathways. These pathways are involved in essential physiological functions such as motor control, memory, cognition, reward system and emotion. Developmental alterations of these neurons can lead to potentially severe pathologies such as motor disorders, neurodegenerative or neuropsychiatric diseases. Among them, Lesch-Nyhan disease represent a rare neurodevelopmental disorder caused by mutation of the HPRT1 gene leading to total or partial loss of a key enzyme in the purine salvage pathway: HGPRT.

To explore the mechanisms underlying the development of dopaminergic neurons and the pathologies involving them, human pluripotent stem cells have proven to be an interesting in vitro model. To elucidate the pathway involved in the genesis of DA neurons, the implementation of a high-throughput screening test based on human pluripotent stem cells to identify modulators of dopaminergic neurogenesis was envisaged. In the past few years, several protocols have been developed to model the development of dopaminergic neurons starting from these cells, especially in the context of research on Parkinson's disease. During my PhD thesis, I modified these protocols to allow the differentiation of dopaminergic progenitors in a miniaturized format adapted to high-throughput screening of small molecules in a systematic way.

I then screened a library of molecules to identify potential compounds to increase the neurogenesis of ventral midbrain dopaminergic progenitors as a proof of principle for this test. Given the involvement of dopaminergic neurons in Lesch-Nyhan disease and the potential role of purines in brain development, a library containing purinergic ligands and adenosine-dependent pathways was chosen. This screening allowed me to identify an adenosine A3 receptor agonist as a potential candidate. This compound showed efficiency at increasing the production of progenitors competent to the differentiation in dopaminergic neurons from healthy PSC. It also corrected the default of genesis of dopaminergic neurons induced by HGPRT loss of function in a PSC line model of Lesch-Nyhan disease.

The development of such an assay paves the way for the screening of larger molecules libraries for protocol optimization or therapeutic research for neurodevelopmental pathologies such as LND or, on a larger scale, involving nDA. The results obtained from this work would also allow us to explore the role of the adenosine receptor targeted by the compound in the nDA establishment and its potential involvement in Lesch-Nyhan disease

université PARIS-SACLAY
ÉCOLE DOCTORALE
Innovation thérapeutique
du fondamental à l'appliqué
(ITFA)

Titre : Développement d'un test de criblage à haut débit basé sur les cellules souches pluripotentes permettant d'identifier des modulateurs de la neurogenèse dopaminergique chez l'Homme. Les voies dépendantes des purines et la Maladie de Lesch-Nyhan comme preuve de principe.

Mots clés : Cellules souches pluripotentes humaines. Neurones dopaminergiques. Criblage à haut débit. Voies purinergiques. Maladie de Lesch-Nyhan

Résumé : Les neurones dopaminergiques du système nerveux central sont principalement localisés dans une région du cerveau appelée le mésencéphale ventral. Ils sont divisés en plusieurs sous-groupes projetant sur différentes structures du cerveau formant ainsi les voies dopaminergiques. Ces voies sont impliquées dans la réalisation de fonctions physiologiques essentielles telles que le contrôle moteur, la mémoire, la cognition, le système de récompense ou encore les émotions. Les altérations du développement de ces neurones peuvent conduire à l'apparition de pathologies potentiellement sévères comme des troubles moteurs, des pathologies neurodégénératives ou neuropsychiatriques. C'est le cas de la maladie de Lesch-Nyhan, une pathologie neurodéveloppementale rare causée par la mutation du gène HPRT1 conduisant à un déficit total ou partiel d'une enzyme clé dans la voie de recyclage des purines : l'HGPRT.

Afin de pouvoir explorer les mécanismes à l'origine du développement des neurones dopaminergiques et des pathologies les impliquant, les cellules souches pluripotentes humaines se sont avérées être un modèle in vitro intéressant. Ces dernières années, plusieurs protocoles ont été développés afin de modéliser le développement des neurones dopaminergiques et de leurs progéniteurs à partir de ces cellules, en particulier dans le cadre de la recherche sur la maladie de Parkinson. Au cours de ma thèse, j'ai adapté ces protocoles afin de réaliser la différenciation des progéniteurs du mésencéphale dans un format miniaturisé adapté au criblage à haut débit de petites molécules de façon systématique.

J'ai ensuite criblé une banque de molécules afin de chercher à identifier des composés potentiels permettant d'augmenter la neurogénèse des progéniteurs dopaminergiques du mésencéphale ventral comme preuve de principe de ce test. Etant donnée l'implication des neurones dopaminergiques dans la maladie de Lesch-Nyhan et du rôle potentiel des purines dans le développement du cerveau, une banque contenant des ligands purinergiques et des voies dépendantes de l'adénosine a été choisie. Ce criblage m'a permis d'identifier un agoniste du récepteur A3 à l'adénosine comme candidat potentiel. Ce composé s'est avéré efficace pour augmenter le taux de progéniteurs compétents pour la différenciation en neurones dopaminergiques à partir de CSP saines. Il a aussi permis de corriger le défaut de genèse des neurones dopaminergiques lié à la perte de fonction de l'HGPRT dans une lignée de CSP modèle de la maladie de Lesch-Nyhan.

Le développement d'un tel test ouvre la voie pour le criblage de plus larges banques de molécules pour l'optimisation du protocole et la recherche de traitement pour des pathologies neurodéveloppementales comme la LND ou, à plus grande échelle, impliquant les nDA. Les résultats obtenus à l'issu de ces travaux nous permettraient également d'explorer le rôle du récepteur à l'adénosine ciblé par le composé dans la mise en place des nDA et son implication potentielle dans la maladie de Lesch-Nyhan.