



Laboratoire de neurobiologie du développement

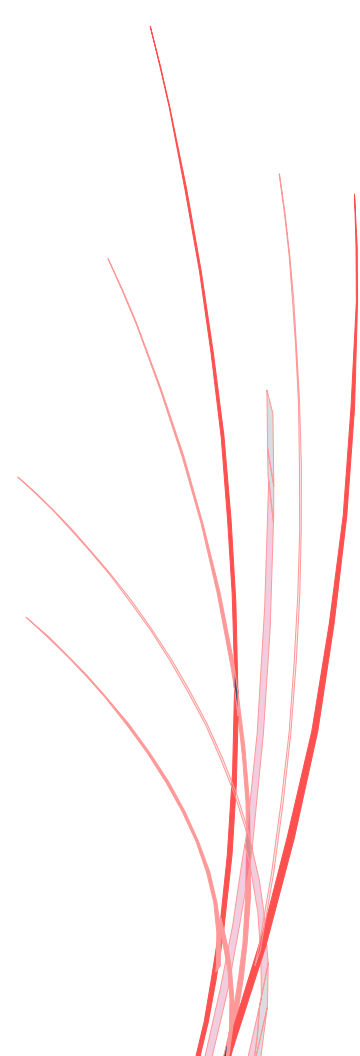
Professeur Brigitte Malgrange

Dr. Laurence Delacroix

*Etude des surdités génétiques
grâce à l'utilisation de cellules
souches à pluripotence induite
humaines et leur différenciation
en cellules cochléaires*

Amandine CZAJKOWSKI

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en
Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques.
Année académique 2019-2020



*Etude des surdités génétiques
grâce à l'utilisation de cellules
souches à pluripotence induite
humaines et leur différenciation
en cellules cochléaires*

Résumé

La surdité est un problème de santé majeur qui touche une proportion toujours grandissante de la population mondiale. Ces pertes auditives résultent majoritairement de dommages causés aux cellules ciliées, impliquées dans la détection du son, ou de leurs neurones afférents présents au sein de l'oreille interne. Ces dommages sont irréversibles puisque ces cellules otiques sont incapables de régénérer. Parmi les facteurs en cause, la génétique joue un rôle prépondérant dans le développement des surdités neurosensorielles. Si de nombreux modèles murins existent, la translation à l'Homme des connaissances ainsi acquises n'est pas toujours efficace, et il est donc primordial de développer des modèles d'études humains éthiquement acceptables. Au cours de ce travail, nous avons utilisé les hiPSCs et leur différenciation en cellules ciliées de l'oreille interne afin d'étudier deux cas de surdités génétiques. Le premier est associé au syndrome d'Alström, une pathologie rare résultant de la mutation récessive du gène *ALMS1*. Les patients développent de nombreux symptômes d'intensité variable parmi lesquels l'obésité, le diabète de type II, une cardiomyopathie dilatée, des troubles rénaux et hépatiques, une rétinopathie et une surdité neurosensorielle bilatérale progressive. Le second gène étudié est le gène *CDK5RAP2*, dont la mutation mène à une forme de microcéphalie héréditaire primaire (MCPH) suite à la division asymétrique précoce des progéniteurs neuronaux. Bien que leurs mutations entraînent des phénotypes drastiquement différents, ces deux protéines essentielles à la fonction auditive sont exprimées au sein d'une même structure : le centrosome/corps basal des cellules.

Au cours de ce travail, nous avons dans un premier temps confirmé l'expression centrosomale d'*ALMS1* et de *CDK5RAP2* dans les fibroblastes humains, les hiPSCs et les progéniteurs otiques dérivés de ces hiPSCs. Nous avons également noté des anomalies du centrosome lorsqu'*ALMS1* ou *CDK5RAP2* est muté. Ainsi, la mutation d'*ALMS1* mène à un accroissement de la distance intercentriolaire corrélée à une réduction du marquage centrosomal de CNAP-1. La mutation de *CDK5RAP2* aboutit également à une réduction du signal de CNAP-1 mais cette fois sans affecter la distance entre les centrioles. Ces résultats suggèrent que la protéine *ALMS1* ancre CNAP-1 aux extrémités des centrioles et que, lorsqu'elle est mutée, trop peu de CNAP-1 est fixé à ces structures, entraînant un affaiblissement du lien intercentriolaire. Le lien entre les protéines *CDK5RAP2* et CNAP1 est moins clair. *CDK5RAP2* pourrait être impliquée dans le recrutement, la stabilisation ou la modulation des partenaires de CNAP-1. Son absence induit également une réduction significative des niveaux de γ -TUBULINE dans les fibroblastes *CDK5RAP2*, ainsi que des cassures dans la plaque équatoriale des hiPSCs en mitose. Cependant, les cellules *CDK5RAP2* sont capables de former des fuseaux mitotiques et de se diviser. Ces résultats combinés à ceux disponibles dans la littérature actuelle suggèrent que *CDK5RAP2* est important pour l'axe de division. Finalement, un modèle de différenciation 3D des hiPSCs en cellules otiques nous a permis de conclure que les mutations d'*ALMS1* et de *CDK5RAP2* n'impactent pas le développement de progéniteurs otiques. Certaines de ces dernières se différencient ensuite en cellules exprimant *POU4F3*, un marqueur précoce de cellules ciliées. Nous avons également pu observer dans les organoïdes *ALMS1* la présence de cellules ciliées plus matures arborant à leur surface apicale une touffe stéréociliaire, ce qui est en accord avec l'apparition post-natale des surdités chez les patients atteints du syndrome d'Alström. Il est maintenant primordial de s'intéresser à la maintenance de ces cellules ciliées en réalisant des cultures à très long terme, ce qui peut être facilité par l'utilisation d'un bioréacteur. Notons que ces cellules ciliées plus matures n'ont jamais été observées dans les organoïdes *CDK5RAP2*, bien que le patient

entende à la naissance. Ce résultat suggère qu'il existe, dans ce cas précis, un biais de notre modèle d'étude et qu'un mécanisme compensatoire est présent au cours du développement embryonnaire.

Abstract

Hearing loss is a major public health concern, as it affects 5% of the worldwide population. Amongst the various causing factors, genetic mutations are implicated in 60% of early-onset hearing loss. Deafness is mainly due to irreversible damages caused to the sensory hair cells of the inner ear or to their afferent neurons. Animal models are commonly used to model human pathologies, unfortunately, the results obtained often failed to be translated to humans. Working with human models is thus essential to understand the mechanisms underlying hereditary hearing loss. In this context, we used hiPSCs and their differentiation into sensory hair cells to study two cases of hereditary deafness. The first one is due to the mutation of *ALMS1* gene leading to Alström syndrome (AS). AS patients present several symptoms including obesity, type II diabetes, dilated cardiomyopathy, kidney and liver failures, retinopathy and childhood bilateral sensorineural hearing loss. The second case concerns a composite mutation on *CDK5RAP2* gene leading to MCPH, a form of microcephaly, and progressive sensorineural hearing loss in childhood. Although both *ALMS1* and *CDK5RAP2* proteins are expressed at the centrosome/basal body of cells, our results suggest distinct roles in hair cells.

We first confirmed the centrosomal expression of *ALMS1* et *CDK5RAP2* in wild type human fibroblasts, hiPSCs and otic progenitors (OSCs). Interestingly, *ALMS1* mutation led to an increase in the intercentriolar distance correlated with a reduction of CNAP1 expression in fibroblasts, hiPSCs and OSCs. *CDK5RAP2* also led to a reduction of CNAP1 immuno-labelling without affecting centriolar cohesion. Altogether, these results suggest that the mutation in *ALMS1* reduces the anchorage of CNAP1 to the centrioles and weakens the intercentriolar root, thereby increasing the distance between centrioles. *CDK5RAP2* is expressed in the pericentriolar material of the centrosome known to be a platform of protein recruitment. Upon *CDK5RAP2* mutation, less CNAP1 proteins was recruited to the centrosome but it was not associated with cohesion splitting. *CDK5RAP2* mutated fibroblasts also contain less γ -TUBULINE however, cells are still able to form mitotic spindles and to divide, similarly to *ALMS1* mutated and wild type cells. We also showed that *ALMS1* and *CDK5RAP2* mutated hiPSCs can be successfully derived into otic progenitors, indicating that the mutations do not affect progenitor development. *ALMS1* and *CDK5RAP2* mutated organoids both give rise to cells expressing *POU4F3*, an early marker of hair cells. In *ALMS1* mutated organoids, these cells further differentiate into more mature hair cells expressing *MYO7A* and harboring a hair bundle-like structure at their apical surface. This is consistent with the fact that AS patients develop hearing impairment around 7 years of age, and that deafness likely results from otic cell degeneration. To study the maintenance of *ALMS1* mutated hair cells, we plan to perform long term cultures of organoids, for which the use of a bioreactor such as CERO will be helpful. Interestingly, we never observed these mature *MYO7A* positive cells in *CDK5RAP2* mutated organoids. As the patient was not deaf at birth, we absolutely need to determine if this absence of hair cells is inherent to our culture model and if it could be due to a missing a compensatory mechanism that happens during the embryonic development of the inner ear.

À Elle, et à Lui.

À la famille que nous sommes et à l'avenir que nous construisons.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à adresser mes plus sincères remerciements aux Pr. Philippe Lefebvre, Dr. Alain Chariot, Dr. Rachelle Franzen et Dr. Laurent Nguyen pour m'avoir suivie au cours de ma thèse et pour l'avoir enrichie de leurs suggestions et remarques pertinentes. Je remercie également le Dr. Aziz El-Amraoui et le Dr. Didier Dulon pour avoir accepté de se joindre à eux dans la lecture et l'évaluation de ce travail, ainsi que pour le temps qu'ils y ont consacré.

Mes remerciements les plus vifs, mais également ma plus grande gratitude, vont à mes promotrice et co-promotrice Brigitte Malgrange et Laurence Delacroix. Merci Brigitte de m'avoir accueillie dans votre équipe, de m'avoir accompagnée dans la réalisation de cette thèse et d'avoir su être présente dans les moments les plus difficiles comme dans les plus exaltants. Merci de votre disponibilité infaillible. Et surtout, merci de m'avoir fait grandir durant ces cinq années passées à vos côtés, de m'avoir appris autant scientifiquement qu'humainement. Je vous en serai éternellement reconnaissante. Merci Laurence pour avoir été là du début jusqu'à la fin de ce parcours semé d'embûches. Merci pour ton écoute. Merci pour ton sourire. Merci pour ton soutien. Merci pour tes idées. Merci pour ta patience. Merci pour ta gentillesse. Merci pour ta passion. Merci pour toutes ces choses que tu offres spontanément aux autres, sans limites et sans attentes, parce que tu es une personne incroyable.

Je souhaite également remercier Kevin Hanon pour m'avoir encadrée durant ma formation sur les hiPSCs et Bilal d'avoir partagé les week-ends « de garde » hiPSCs avec moi. Merci à Bernard Coumans pour sa jovialité et son énergie communicative. C'est un plaisir de travailler à tes côtés, tu es une véritable source d'inspiration et un puits de sagesse. Merci aussi d'avoir prêté une oreille attentive à toutes mes plaintes et lamentations !

Je souhaite ensuite remercier ceux qui ont donné une dimension humaine incroyable à ces dernières années. Merci, Anaïs Mounier d'avoir partagé l'aventure cellules souches avec moi. Tu fais partie des plus belles rencontres que j'ai eu l'occasion de faire au cours de cette thèse. Ton optimisme infaillible, ta douceur et ta gentillesse ont ensoleillé mes pires journées... Et ton goût immodéré pour dîner au soleil dès que la barre des températures dépassait les 12°C aussi ! Merci de m'avoir soutenue pendant ma grossesse, d'avoir gardé le secret et de m'avoir autant aidée au quotidien. Descendre à la supérette du CHU n'a plus la même saveur depuis que tu n'es plus là. Heureusement qu'il y a les technologies modernes pour nous permettre de rester en

contact malgré les kilomètres, et de pouvoir s'envoyer autant de photos et de vidéos de nos enfants que possible ! Tu es incroyable, Patate.

Merci, Sébastien Verteneuil <3 pour ton soutien indéfectible. Tu es ma soupape de sécurité, celui qui m'empêche d'exploser quand la colère est trop grande, celui à qui je peux tout dire sans rien cacher, ni édulcorer. Nos discussions sans tabous ni barrières sont inestimables à mes yeux.

Merci à toi, Odile Bartholome, avec qui j'ai commencé cette aventure mouvementée. Notre relation a été forgée dans la douleur des répétitions F.R.I.A. et des longues conversations scientifiques. Merci pour les incroyables découvertes culinaires auxquelles tu nous as initiés grâce aux Discoverathons. J'aimerais également te remercier pour tes précieux conseils et ton instinct protecteur. Ta force, ton caractère et ce petit côté assumé qui se libère de toute convention sociale font de toi une femme incroyable et inspirante. Je suis fière et heureuse de te compter parmi mes amis et j'espère que ça durera encore longtemps ! A quand nos prochaines vacances ?

Merci Margaux d'avoir partagé ton temps et tes conseils avec moi. J'ai toujours pu compter sur ta petite épaule pour pleurer. Et merci de ne jamais prendre ombrage de nos taquineries sur ta petite taille, d'ailleurs :p Je t'aime très fort, petit bouchon, même si tu confonds les corbeilles et les corneilles !

Et bien sûr, je n'oublie pas Ronald et Fanny ! Ron, partager le bureau avec toi est un vrai plaisir. J'espère pouvoir continuer pendant longtemps à discuter des meilleures crèmes pour les mains, et à partager nos expériences de junkies du spray décongestionnant nasal. Bientôt, on s'échangera autant de photos de Winter, Ascaris et Fortis qu'Anaïs et moi de Samuel et Eleonor ! Je te souhaite la plus belle expérience de papa-chat du monde. Bien sûr, je n'oublie pas que je n'ai pas été invité à ta petite soirée (oui, je te le rappellerai toute ta vie). En parlant de soirée, bientôt la prochaine soirée jeux vidéo avec Crash Team Racing !

Merci Fanny pour ta douceur. Tu es une femme merveilleuse dont la discrétion équilibre parfaitement le caractère fort qu'on sent tapi sous la surface. Une véritable perle qui vaut la peine d'être connue !

Je tiens ensuite à remercier toutes les belles personnes que j'ai eu la chance de rencontrer et de côtoyer durant ces 5 années : Amandine D., Steve, Renaud, PB, Quentin, Susana, Coralie (<3), Julie, Anouk, Marina, Natacha, Tine... Merci à l'ensemble des membres du GIGA Neurosciences pour les moments partagés.

Finally, je souhaiterais écrire une pensée à ma famille. Merci à mes parents, bien sûr, de m'avoir permis d'en arriver là où j'en suis et d'avoir fait de moi la personne que je suis aujourd'hui. Merci à mon frère qui occupe une place de choix dans mon cœur. Merci à mon incroyable grande sœur, pour tout... Enfin, sauf pour la délation dont tu as fait preuve à mon égard quand nous étions enfants, ainsi que d'avoir fait de moi ton esclave en échange de la promesse que je pourrais te brosser les cheveux ensuite, ainsi que pour t'être toujours attribuée la plus grosse « moitié » du tableau noir, et pour m'avoir poussée dans une caisse dans le garage, et pour... La liste est trop longue, si je continue, elle doublera l'épaisseur de ce manuscrit ! ;) Je t'aime infiniment, soeurette. Merci d'être là. Je suis heureuse de partager avec toi cette nouvelle aventure qu'est la vie de maman. Merci à Hadrien pour sa gentillesse (et pour ne jamais râler qu'on débarque chez vous le week-end). Merci à ma jolie Princesse Lila pour les merveilleux sourires dont tu me gratifies, et pour la promesse que je lis dans tes yeux des 400 coups qu'on fera dans le dos de tes parents !

Bien sûr, mes remerciements les plus chaleureux vont à ma moitié, Julien. Merci mon amour d'avoir accepté jusqu'aux parties les plus sombres de mon être, d'avoir cherché patiemment chacun des morceaux manquants et de les avoir consolidés avec tout l'amour et la douceur dont j'avais besoin. Merci de m'avoir écoutée (même pendant mes monologues !), de m'avoir protégée et de m'avoir appris à vivre. Tu es mon amour, mon diamant, ma merveille. J'espère que ces neuf années déjà passées à tes côtés ne sont que les premières d'une très longue série, et que même lorsque nous serons de vieux croûtons aigris, nous nous aimerons encore. Merci d'écrire avec moi la plus magique des histoires : celle de notre petite Châtaigne. En parlant de toi, Châtaigne d'amour... Tu es la plus belle chose qui ne me soit jamais arrivée. Tes petits bras ont le pouvoir magique de faire disparaître les chagrins et les soucis lorsqu'ils se glissent autour de mon cou. Pas un jour ne passe sans que je m'émerveille devant tes sourires mutins et ton air de canaille. Ne grandis pas trop vite, Pimprenelle, parce que je compte bien profiter de chaque moment passé à tes côtés !

Je terminerai par te remercier, lecteur, de prendre le temps de lire ce travail.

Abréviations

2i	2 inhibiteurs
ABR	Auditory Brainstem Response
ACP	Adenomatous Polyposis Coli
AND(c)	Acide DésoxyriboNucléique (complémentaire)
ALK5	Anaplastic Lymphoma Kinase
ALMS1	Syndrome Alströme 1
AMPC	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ARN	Acide RiboNucléique (messenger)
Atoh1	Atonal bHLH transcription factor Homolog 1
BMP	Bone Morphogenic Protein
BrdU	BromodésoxyUridine
BSA	Bovine Serum Albumin
CDM	Chemically Defined Medium
CCEs ou CCI	Cellules ciliées externes ou internes
CDK5RAP2	CDK5 Regulatory subunit Associated Protein 2
CDM	Chemically Defined Medium
CEP	Centrosomal Protein
CF	Centriole Fille
CGP	Cellules germinales précoces
CHK	Checkpoint kinase
CK1	Casein kinase 1
CM	Centriole Mère
C-NAP1	Centrosome-Associated Protein 1
CS	Cellules de Soutien
DAPI	4',6-DiAmidino-2-PhénylIndole
dBs	Décibels
DFNA	Deafness Autosomal dominant
DFNB	Deafness Autosomal recessive
DFNX	Deafness X-linked
DMEM	Dulbecco Modified Eagle's Minimal Essential Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DVL	Dishevelled

EB	Embryoid body
EDTA	Ethylène diamine tétraacétique
EGF	Epidermal Growth Factor
ESC	Embryonic Stem Cells
EYA1/4	Eyes absent homolog 1/4
FBS	Fetal Bovine Serum
FGF(R)	Fibroblast Growth Factor (Receptor)
GCV	Ganglion cochléo-vestibulaire
GDF	Growth Differentiation Factor
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
HDAC	Histone déacétylase
Hes1/5	Hairy Enhancer of Split 1/5
hESCs	Human Embryonic Stem cells
hFib	Human Fibroblasts
hiPSCs	Humain induced Pluripotent Stem Cells
IFT	IntraFlagellar Transport
IGF	Insulin Growth Factor
I-STEM	Institut des cellules Souches pour le Traitement et l'Etude des maladies Monogéniques
Jag1	Jagged 1
Klf4	Kruppel-Like Factor 4
KSR	Knockout Serum
LEF	Lymphoid enhancer factor 1
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LRP	Lipoprotein Receptor-related Protein
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MCPH	Microcephaly Primary Hereditary
MEFs	Mouse Embryonic Fibroblasts
mEpiSCs	Mouse Epiblastic Stem Cells
mESCs	Mouse Embryonic Stem Cells
miPSCs	Mouse induced pluripotent Stem cells
MTOC	Microtubule Organizing Center
Myo7A	Myosin 7 a
NGS	Neurones du ganglion spiral
NICD	Notch Intracellular Domain

NMD	Non-sens Mediated Decay
NNE ou ENN	Non-Neural Ectoderm ou Ectoderme non-neural
OC	Organe de Corti
OEPD	Otic-epibranchial Placode Domain
OMM	Organoid Maturation Medium
OSCs	Otic Stem Cells
OSKM	OCT4/SOX2/KLF4/c-MYC
PAX2/8	Paired box protein 2/8
PCM ou MPC	Peri-Centriolar Material ou Matériel Péri-Centriolaire
PCP	Planar Cell Polarity
pHH3	phospho Histone H3
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLC γ	PhosphoLipase C γ
POEs	Progéniteurs otiques de l'épithélium
PONs	Progéniteurs otiques neuronaux
Pou4F3	POU class 4 homeobox3
PPR ou RPP	Pre-Placodal Region ou Région Pré-Placodale
r.p.m	rotation par minute
ROS	Reactive Oxygen Species
RT-qPCR	Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction
RV	Rampe Vestibulaire
SHH	Sonic HedgeHog
sh/siRNA	small hairpin / small interfering RiboNucleic Acid
Six1	Sineoculis homeobox homolog 1
SOX 2/10	Sex determining region on Y-Box 2/10
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
T β RI ou T β RII	TGF β Receptor type I or type II
TCF	T-Cell Factor
Tfap2a/c	Transcription Factor AP-2 α/γ
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TUJ1	Tubuline β III - Clone TUJ1
VPA	Valproic Acid
WNT	Wingless-related integration site
WT	Wild Type
γ TuRC	γ Tubuline Ring Complex

Table des matières

Résumé

Abstract

Remerciements

Abréviations

Introduction

1. Anatomie de la cochlée.....	1
2. La physiologie de l'audition	2
3. Développement de l'oreille interne.....	3
3.1. Développement précoce	3
3.2. Le ganglion spiral	5
3.3. L'organe de Corti	6
3.4. Formation de la touffe stéréociliaire.....	7
4. Les cellules souches	9
4.1. Embryogenèse précoce.....	9
4.2. Les cellules souches embryonnaires	10
4.3. Cellules souches pluripotentes induites	11
4.3.1. Reprogrammation naturelle	11
4.3.2. Reprogrammation induite.....	11
4.4. Mécanismes moléculaires impliqués dans le maintien de la pluripotence et de l'autorenouvellement	15
4.4.1. Les facteurs intrinsèques	15
4.4.2. Les facteurs extrinsèques.....	15
5. Différenciation des cellules souches en cellules ciliées.....	21
5.1. Différenciation des mESCs.....	21
5.2. Différenciation des hESCs et hiPSCs	23
6. Les surdités et déficiences auditives	25
6.1. Centrosome, cil et surdité	26
6.1.1. Le centrosome et le cil primaire.....	26
6.1.2. Biogenèse et duplication du centrosome :	27
6.1.3. Les fonctions du centrosome	29

6.1.4. Les fonctions des cils cellulaires non-motiles	30
6.2. Le syndrome d'Alström et le gène <i>ALMS1</i>	30
6.3. La microcéphalie autosomale récessive primaire et le gène <i>CDK5RAP2</i>	32

Objectifs

Matériel et méthodes

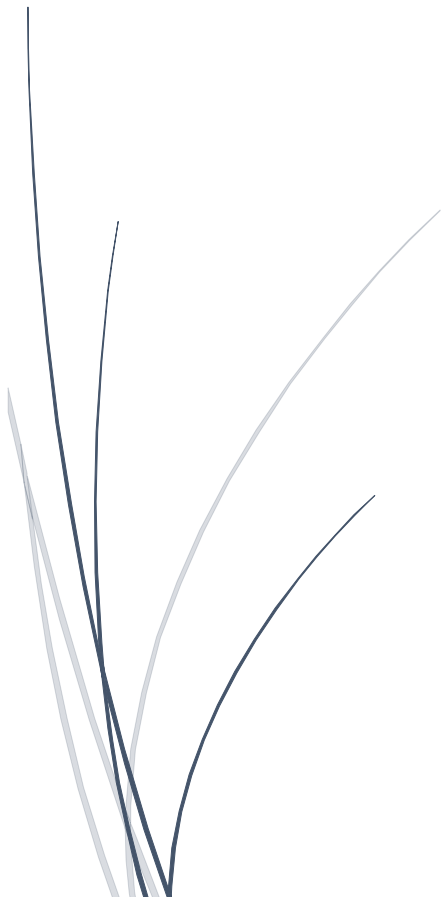
Culture des fibroblastes humains	38
Préparation de MEFs inactivés	38
Reprogrammation des fibroblastes humains en hiPSCs	38
Culture des hiPSCs	39
Différenciation spontanée en 3 feuillets embryonnaires	40
Formation de tératomes	41
Caryotype	41
Différenciation 2D en progéniteurs otiques	41
Différenciation 2D en cellules ciliées	42
Différenciation 3D en cellules ciliées	42
Immunomarquages 2D	43
Incorporation de BrdU	45
Immunomarquage 3D	45
Mesure de la distance entre centrioles	46
RT-qPCR	46
Western blot	47

Résultats

1. Etude du centrosome des fibroblastes humains sains et mutés	50
2. Reprogrammation des fibroblastes provenant de patients atteints de surdité génétique et validation des hiPSCs	54
3. Impact des mutations d' <i>ALMS1</i> et <i>CDK5RAP2</i> dans les hiPSCs	58
4. Différenciation 2D des hiPSCs saines et mutées	63
4.1. Obtention et étude des progéniteurs otiques	64
4.1.1. Induction de progéniteurs otiques (OSCs)	64
4.1.2. Impact des mutations d' <i>ALMS1</i> et de <i>CDK5RAP2</i> dans les OSCs	66
4.2. Différenciation des OSCs en cellules ciliées	68
5. Différenciation 3D des hiPSCs saines et mutées en cellules ciliées	69

5.1. Phase d'induction otique	70
5.2. Phase de maturation des organoïdes	75
5.3. Optimisation de la maturation des organoïdes	80
<i>Discussion et perspectives</i>	
1. Les hiPSCs peuvent être dérivées en cellules otiques suite à l'application de protocoles de différenciation dont l'efficacité est augmentée en culture 3D.....	84
2. La localisation centrosomale d'ALMS1 et de CDK5RAP2 est perdue dans les cellules dérivées de patients.	88
3. Les mutations d'ALMS1 et CDK5RAP2 induisent des altérations centrosomales distinctes.	89
4. La mutation de CDK5RAP2 semble abolir la formation de cellules ciliées matures dans notre modèle d'étude.	93
5. La mutation d'ALMS1 n'altère pas la capacité à générer des cellules ciliées.	94
6. Quelle est la pertinence de l'utilisation des hiPSCs pour l'établissement d'un modèle d'étude des surdités dégénératives ?	95
<i>Conclusion</i>	98
<i>Bibliographie</i>	101
<i>Annexes</i>	102

Introduction



1. Anatomie de la cochlée

La cochlée est la partie de l'oreille interne impliquée dans l'audition. Chez les mammifères, elle s'enroule sur elle-même pour former 2,75 tours de spire. Lorsqu'une spire est observée en coupe transversale (Figure 1), elle laisse apparaître trois rampes contenant du liquide : le canal cochléaire, rempli d'endolymphe, et les rampes tympanique et vestibulaire gorgées de périlymphe. Le canal cochléaire est séparé de la rampe vestibulaire par la membrane de Reissner et de la rampe tympanique par la membrane basilaire. Sur cette dernière repose l'épithélium sensoriel responsable de la fonction auditive : l'organe de Corti.

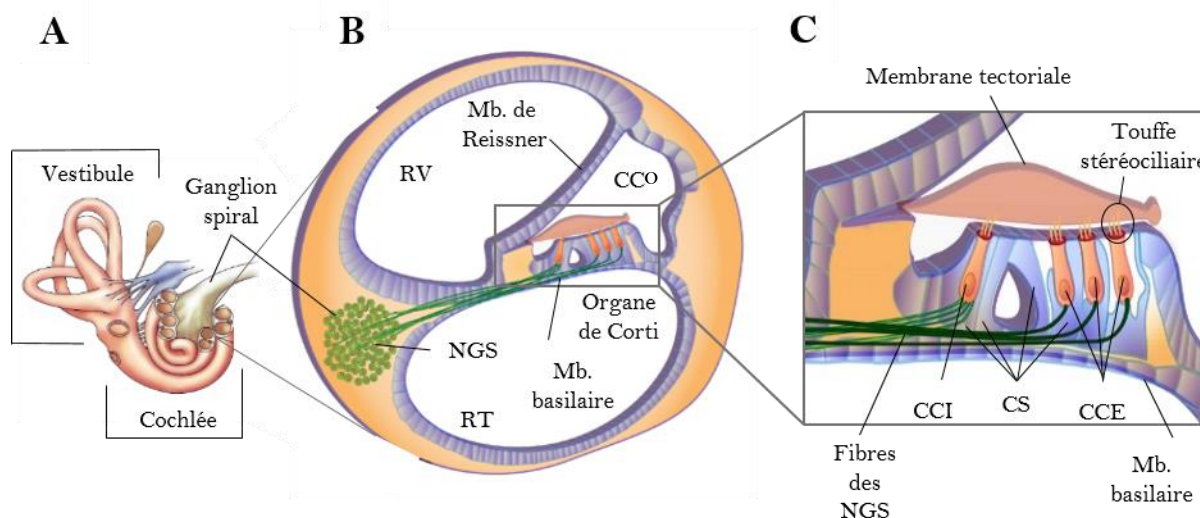


Figure 1 : Représentation schématique de l'oreille interne. A) Représentation 3D de l'oreille interne composée du vestibule et de la cochlée. B) Lorsqu'elle est observée en coupe transversale, la cochlée laisse apparaître trois canaux remplis de liquides : les rampes vestibulaire (RV) et tympanique (RT) gorgées de périlymphe et le canal cochléaire (CCO) rempli d'endolymphe. Le canal cochléaire est séparé des rampes vestibulaires et tympaniques par la membrane de Reissner (Mb. De Reissner) et la membrane basilaire (Mb. Basilaire), respectivement. Sur la membrane basilaire repose l'épithélium sensoriel de la cochlée : l'organe de Corti. C) L'organe de Corti (OC) est une structure hautement organisée composée de plusieurs rangées de cellules sensorielles ciliées ainsi que différents types de cellules de soutien (CS). Les cellules ciliées internes (CCI), alignées sur une rangée, sont responsables de la mécano-transduction du signal sonore. Les cellules ciliées externes (CCE) forment trois rangées cellulaires et sont impliquées dans l'amplification du signal. La surface apicale des cellules ciliées est recouverte d'une touffe stéréociliaire s'ancrant dans la membrane tectoriaire alors que leur base fait synapse avec les neurones du ganglion spiral (NGS).

L'organe de Corti est une structure hautement organisée faite de cellules de soutien (CS) ainsi que de cellules sensorielles ciliées (CC) innervées par les neurones du ganglion spiral (NGSs). Les cellules ciliées s'agencent de part et d'autre du tunnel de Corti en une rangée de cellules ciliées internes (CCI) et 3 rangées de cellules ciliées externes (CCE). Alors que les CCI assurent la mécano-

transduction du signal sonore, les CCE renforcent activement le mouvement de la membrane basilaire et amplifient l'intensité du signal (Davis, 1983; Purves et al., 2001). Chacune des CCs présente à sa surface apicale une touffe stéréociliaire typique organisée en « V » (Raphael and Altschuler, 2003). L'ensemble des touffes stéréociliaires pointe dans une même direction, ajoutant un niveau d'organisation supplémentaire à l'organe de Corti. Il est important de noter que chez les mammifères, la perte des CCs est un processus irréversible en raison de leur incapacité à se renouveler (Brigande and Heller, 2009).

2. La physiologie de l'audition

Pour qu'une onde sonore soit entendue, elle doit être captée par le pavillon de l'oreille externe qui la dirige vers le canal auditif. Au bout de ce canal, l'onde percute la membrane fibreuse tympanique reliée à la chaîne des osselets de l'oreille moyenne. Elle s'amplifie alors en se propageant du marteau à l'enclume, puis de l'enclume à l'étrier. L'étrier étant lui-même connecté à la cochlée par la fenêtre ovale, il lui transmet les vibrations acoustiques perçues, ce qui entraîne la création d'une onde au sein de la périlymphe des rampes vestibulaire puis tympanique (Figure 2). Ce mouvement génère une pression sur la membrane de Reissner en la déformant vers le canal cochléaire. Sous cette poussée, l'endolymphe incompressible n'a d'autre choix que de faire à son tour pression sur la membrane basilaire supportant l'organe de Corti (Hudspeth, 2014; Reichenbach and Hudspeth, 2014). Cela entraîne le déplacement des CCs dont les touffes stéréociliaires sont ancrées dans la membrane tectoriale, et par là-même la déflexion synchronisée des stéréocils et l'ouverture des canaux mécano-sensitifs présents à leur surface (Dong and Olson, 2013). La différence de concentrations ioniques entre l'endolymphe et le cytoplasme entraîne une entrée massive d'ions potassium au sein des CCs, provoquant une dépolarisation et l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants. L'entrée d'ions Ca^{2+} mène au relargage de glutamate à hauteur de la synapse en ruban et au déclenchement de potentiels d'action dans les fibres nerveuses (Goutman et al., 2015). Le signal sonore au départ mécanique est donc transduit en un signal électrique qui peut être relayé le long des fibres nerveuses en passant les différents relais de la voie auditive avant d'atteindre le cortex auditif où l'information est finalement traitée. Soulignons que la fréquence des ondes sonores influence la région de la cochlée stimulée. Les sons les plus aigus sont ainsi détectés par les CCs situées dans le premier tour de spire (la base) de la cochlée, alors que les sons les plus graves sont perçus au niveau du dernier tour (l'apex).

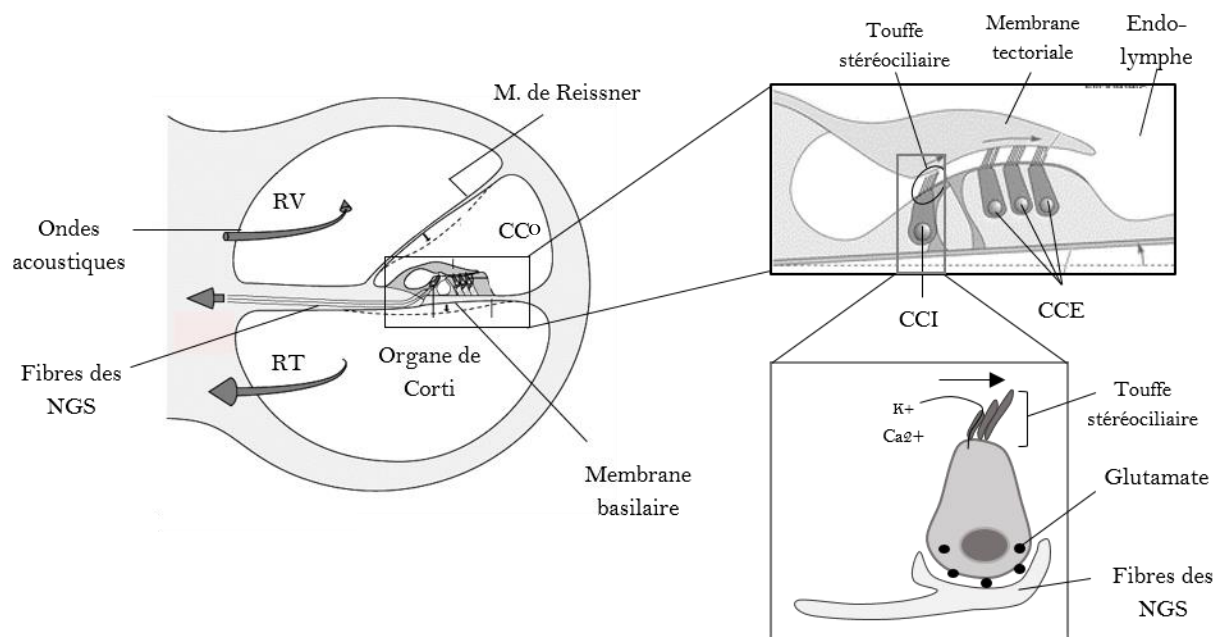


Figure 2 : Transmission du signal acoustique dans la cochlée. Après avoir traversé l'oreille externe, l'onde sonore est acheminée le long de la chaîne des osselets jusqu'à atteindre l'étrier. Ce petit os, relié à la cochlée par la fenêtre ovale, lui transmet les vibrations acoustiques qui se répandent en vagues dans la périlymphe des rampes vestibulaire (RV) et tympanique (RT). Ces mouvements entraînent la déformation de la membrane de Reissner vers le canal cochléaire (CCo), poussant l'endolymphe vers la membrane basilaire sur laquelle repose l'organe de Corti. Les cellules ciliées, dont les touffes stéréociliaires sont ancrées dans la membrane tectoriaie, oscillent au rythme des mouvements de la membrane basilaire, ce qui induit la déflexion des stéréocils et l'ouverture des canaux mécano-sensitifs. Suite à la dépolarisation des cellules ciliées, du glutamate est relargué au niveau des synapses en ruban. Le signal jusqu'alors mécanique est transduit en signal électrique pouvant être relayé le long de la voie auditive primaire jusqu'à atteindre le cortex auditif. NGS : neurones du ganglion spiral ; RT : rampe tympanique ; RV : rampe vestibulaire ; CC : canal cochléaire ; CCI : cellule ciliée interne ; CCE : cellule ciliée externe. Adaptation d'après le site <http://www.ilocis.org> et Xu 2018.

3. Développement de l'oreille interne

3.1. Développement précoce

Le développement de l'oreille interne débute au niveau d'une zone d'ectoderme non-neural (NNE pour « Non-Neural Ectoderm ») située proche du rhombencéphale (Figure 3) et s'initie une semaine après la fécondation chez l'Homme (O'rahilly, 1963), soit à E7 (pour jour embryonnaire E7). Cette première étape est rendue possible par l'activation de la voie BMP. Elle est suivie par la formation de la région pré-placodale (PPR pour « Pre-Placodal Region ») résultant des inhibitions successives des voies de signalisation BMP et Wnt (Koehler et al., 2013; Pieper et al., 2012).

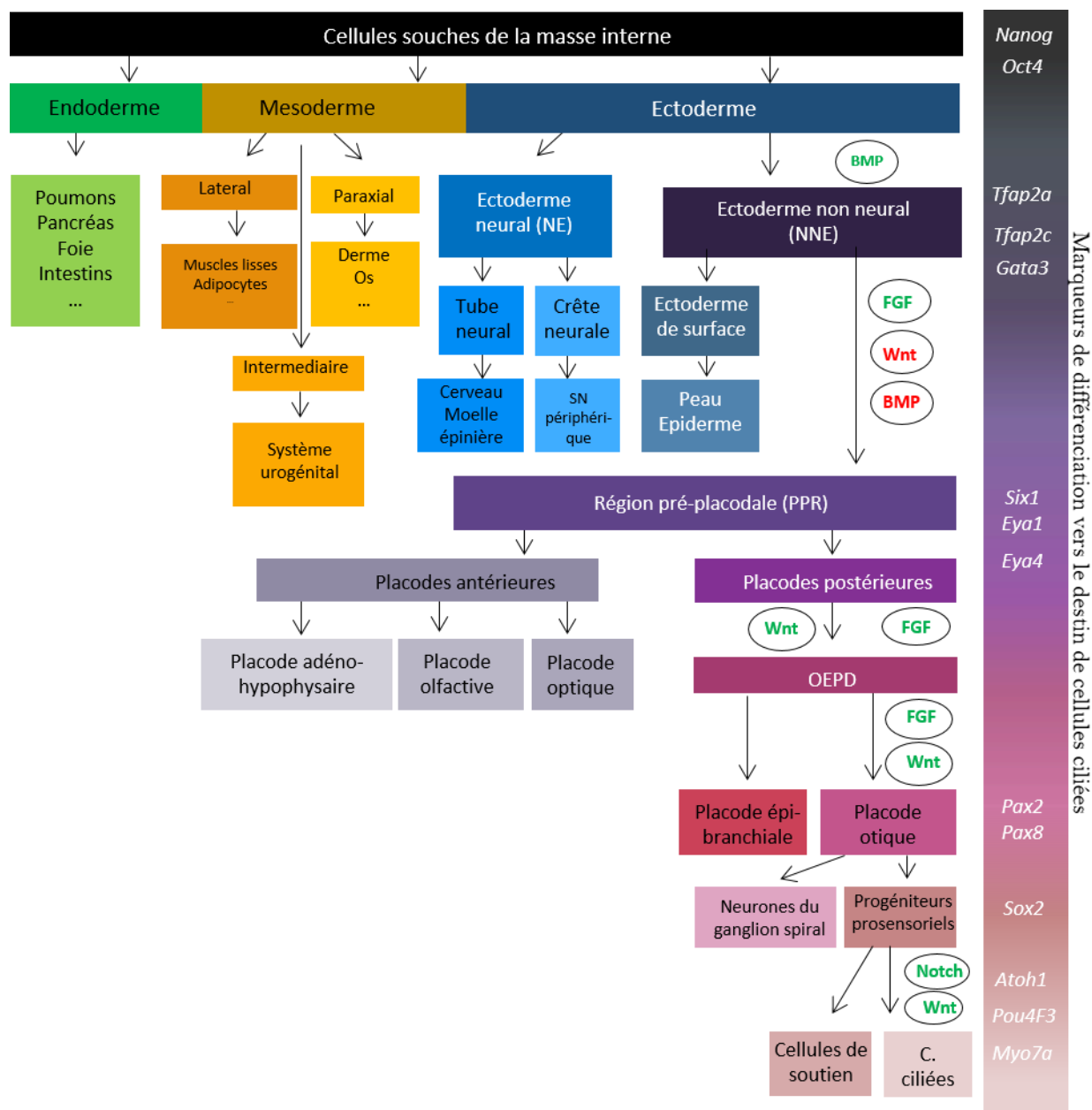


Figure 3 : Développement embryonnaire des cellules souches blastocystaires en cellules cochléaires. Les cellules de la masse interne du blastocyste sont pluripotentes et donc capables de générer les trois feuillettes embryonnaires : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme. L'activation transitoire de la voie BMP induit la différenciation de l'ectoderme en ectoderme non-neural (NNE), caractérisé par l'expression de plusieurs marqueurs dont Tfap2a, Tfap2c et Gata3. La région pré-placodale (PPR) émerge sous l'effet combiné de l'activation de la voie FGF et l'inhibition des voies Wnt et BMP. La PPR exprime Six 1, Eya1 ainsi qu'Eya4 et donne naissance au domaine des placodes épibranchiales et otique (OEPD) puis à la placode otique après activation des voies FGF et Wnt. Une partie des progéniteurs otiques présents se différencient alors en neurones du ganglion spiral alors que d'autres continuent à proliférer au sein du domaine pro-sensoriel. Certains de ces progéniteurs pro-sensoriels expriment des ligands de Notch et se différencient en cellules ciliées alors que ceux exprimant les récepteurs Notch se différencient en cellules de soutien.

La PPR est à l'origine des différents organes sensoriels. Les placodes épibranchiales et otiques (OEPD pour « Otic and epibranchial placode domain ») sont caractérisées par l'expression simultanée de *Pax8* et *Pax2* (Basch et al., 2016; Freter et al., 2008). Sous l'impulsion de la voie Wnt, l'expression de *Pax2* augmente au sein de la placode otique (Taguchi and Nishinakamura, 2017) qui s'invagine ensuite progressivement en une vésicule otique également appelée otocyste. Sa partie ventrale se développera en cochlée alors que la partie dorsale constituera le vestibule (Figure 4). Peu après la cinquième semaine de gestation¹ chez l'Homme (soit S3 pour 3^{ème} semaine post-fécondation) et dès E8,5 chez la souris, une population de cellules appelées neuroblastes migre de la région ventrale de l'otocyste vers le mésenchyme afin d'y établir les futurs ganglions spiral et vestibulaire. Peu de temps après, à E10-12 chez la souris et S10-11 chez l'Homme, des progéniteurs otiques exprimant *Sox2* prolifèrent dans une région bien définie appelée domaine prosensoriel.

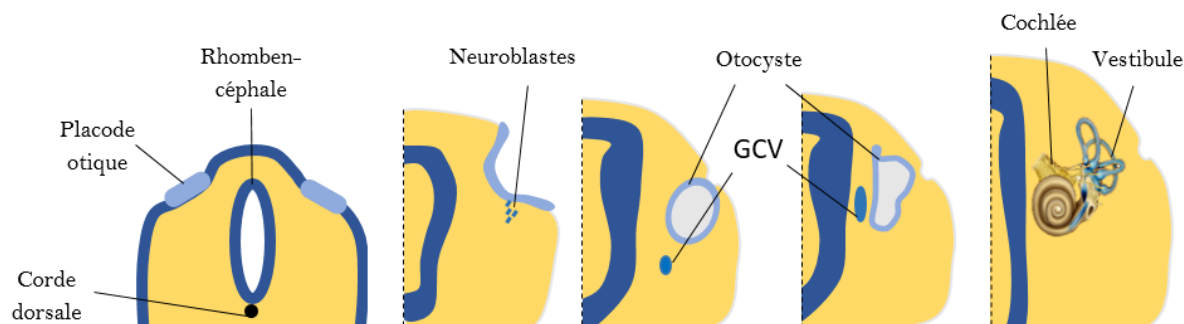


Figure 4 : Développement de l'oreille interne humaine et murine. Le développement de l'oreille interne débute par la formation d'ectoderme non-neural dans une région proche du rhombencéphale au stade embryonnaire E6.5-7.5 chez la souris et E17-18 chez l'homme. Cette zone s'épaissit pour former la placode otique qui s'invagine ensuite dans le mésenchyme en une vésicule appelée otocyste. Le ganglion cochléo-vestibulaire (GCV) est issu de la délamination de neuroblastes au départ de l'otocyste. La partie ventrale de la vésicule otique se développe en cochlée alors que la partie dorsale s'étoffe pour former le vestibule.

3.2. Le ganglion spiral

Le développement du ganglion cochléo-vestibulaire débute très tôt par la migration des neuroblastes au départ de l'otocyste (Figure 4). Vers S5 chez l'Homme, ce ganglion unique se scinde en deux parties distinctes : le ganglion vestibulaire et le ganglion spiral (Bibas et al., 2006). L'innervation de la cochlée par les neurones du ganglion spiral est hautement organisée et s'établit

¹ Le nombre de semaines de gestation est calculé à partir du premier jour des dernières menstruations et correspond donc à l'âge fœtal (nombre de semaines depuis la conception) plus 2 semaines.

conjointement au développement du domaine prosensoriel dès E14.5 chez la souris (Zhang and Coate, 2017). *In fine*, les neurones font synapses avec les CCs de l'organe de Corti. On distingue les neurones afférents de type I innervant les CCs et les neurones de types II connectant les CCEs (Appler and Goodrich, 2011). Les neurones de types I sont beaucoup plus nombreux (90 à 95% du nombre total des NGSs), plus gros et myélinisés, alors que les neurones de type II ne représentent que 5 à 10% des NGSs, sont plus petits et amyéliniques. Plusieurs neurones de type I font synapse avec une CCI unique, alors qu'un seul neurone de type II peut connecter de 5 à 30 CCE (Fritsch et al., 2015). Il est intéressant de noter que cette distinction en neurones de type I ou de type II est tardive, n'apparaissant qu'entre S18-20 chez l'Homme et à P6-7 (pour « post-natal ») chez la souris.

Bien que moins bien décrite, la glie joue un rôle majeur dans l'audition. Elle est responsable de la myélinisation des axones des neurones de type I, ce qui optimise la transduction du signal électrique. Elle assure également aux neurones un support trophique essentiel à la croissance neuritique des NGSs (Jeon et al., 2011). Il est à noter que les cellules gliales, qu'elles soient de Schwann ou satellites, dérivent de la crête neurale.

3.3. L'organe de Corti

L'organe de Corti se développe à partir du domaine prosensoriel (Figure 5). Progressivement, les cellules *Sox2* positives quittent le cycle cellulaire sous l'influence de l'inhibiteur du cycle cellulaire *p27^{KIP1}*, en suivant une vague partant de l'apex vers la base de la cochlée (Kelley, 2006). Une partie des progéniteurs post-mitotiques commence alors à exprimer le facteur de transcription *Atoh1*, un régulateur clé de la différenciation en cellules sensorielles. Grâce à une boucle de rétrocontrôle positif, il favorise sa propre expression ainsi que celle d'autres gènes spécifiques aux CCs tel que *Pou4F3* (Wu and Kelley, 2012). Parallèlement, son inhibition latérale mène à la différenciation en cellule de soutien.

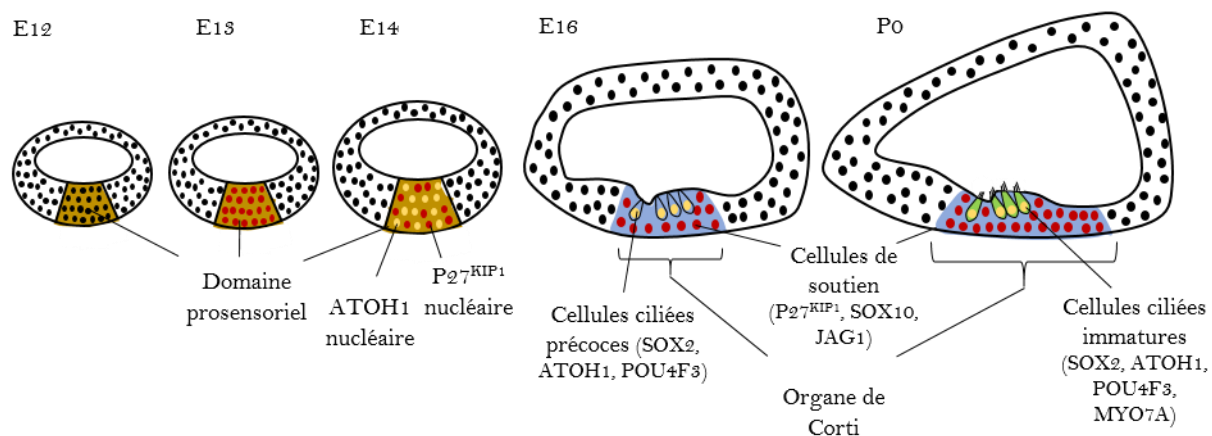


Figure 5 (page précédente) : Schématisation du développement de l'organe de Corti. Les progéniteurs otiques prolifèrent au sein du domaine prosensoriel avant de quitter le cycle cellulaire sous l'impulsion de $p27^{kip1}$. Une sous-population de progéniteurs exprime alors le facteur de transcription *Atoh1*, entraînant l'expression d'autres gènes spécifiques aux cellules ciliées tel que *Pou4F3*. *Sox2* diminue très progressivement dans les cellules ciliées jusqu'à disparaître à leur stade mature, alors qu'il reste présent dans les cellules de soutien. Schéma adapté à partir de la publication de Kelley, 2012.

Plus précisément, les CCs expriment les ligands DELTA-1 et JAGGED-2 capables de lier et d'activer les récepteurs transmembranaires Notch se trouvant sur les cellules adjacentes. Il y a alors clivage du récepteur, libération d'un fragment intracellulaire (NICD, Notch Intracellular Domain) et activation des facteurs de transcription « Hairy and Enhancer of Split » *Hes1* et *Hes5*, deux inhibiteurs transcriptionnels d'*Atoh1* (Lanford et al., 1999; Lee et al., 2017). Cette vague de différenciation part, cette fois-ci, de la base de la cochlée pour s'étendre vers l'apex et permet donc l'émergence des CCs aussi bien que cellules de soutien (Fekete et al., 1998; Laine et al., 2010; Oesterle et al., 2008). Les premières CCs apparaissent vers E15.5 chez la souris et vers S12-13 chez l'Homme. Elles co-expriment à ce stade SOX2 et des marqueurs de CCs tels qu'ATOH1, POU4F3 et MYOSINE 7A (MYO7A), une protéine impliquée aussi bien dans la morphogénèse des stéréocils que dans la transduction du signal sonore. Au cours de leur maturation, les CCs perdent l'expression de *Sox2* alors que celle-ci se maintient et se renforce dans les cellules de soutien.

Il est important de mentionner que bien que la cochlée soit totalement développée à la naissance (soit à P0) chez la souris, elle n'est pas encore mature et ne sera totalement fonctionnelle qu'une quinzaine de jours plus tard. L'Homme est quant à lui capable de percevoir des sons dès S20-21 (Pujol et al., 1991).

3.4. Formation de la touffe stéréociliaire

Les stéréocils présents à la surface apicale des CCs sont des extensions cytoplasmiques constituées de filaments d'actine et ne sont donc pas, à proprement parler, des cils puisque ces derniers sont composés de microtubules. La seule véritable structure ciliaire présente à la surface des CCs est le cil primaire spécialisé nommé kinocil. Il est essentiel à l'organisation correcte de la touffe stéréociliaire (Figure 6). Le kinocil s'ancre et s'allonge à partir du centriole mère composant le corps basal (cf. Chapitre 6.1.1) avant d'émerger au centre de la surface apicale des CCs parallèlement à de nombreuses microvillosités enrichies en actine (Falk et al., 2015; Tilney et al., 1992). Le kinocil migre alors vers le bord latéral distal de la cellule, entraînant avec lui plusieurs microvillosités qui s'allongeront en stéréocils et s'organisent en trois rangées de taille croissante connectées entre elles par des filaments protéiques. Ces liens apicaux assurent une déflexion

synchronisée des stéréocils et permet l'ouverture des canaux mécano-sensibles qui y sont reliés (McGrath et al., 2017). Une fois développée, la touffe stéréociliaire est agencée en un V au sommet duquel se trouve le kinocil (Frolenkov et al., 2004).

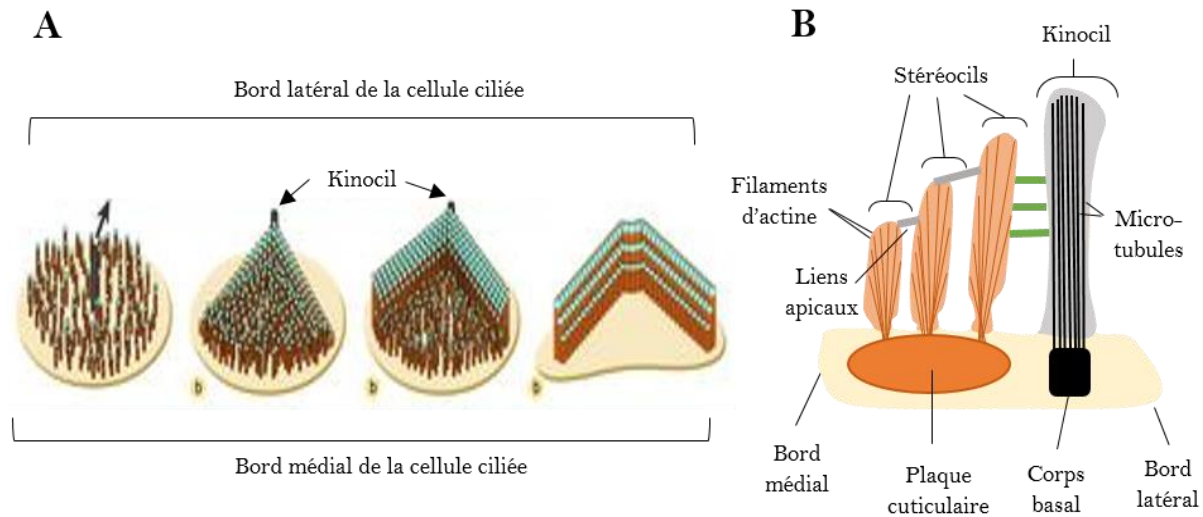


Figure 6 : Formation de la touffe stéréociliaire. A) Le kinocil s'allonge à partir du corps basal et émerge au centre de la surface apicale des cellules ciliées précoces parmi les nombreuses microvillosités enrichies en actine. Il migre vers le bord latéral distal de la cellule en entraînant avec lui des stéréocils qui s'agencent alors en trois rangées de taille croissante. La touffe stéréociliaire mature est une structure organisée en V au sommet de laquelle se trouve le kinocil. B) Coupe transversale d'une touffe ciliaire. Les stéréocils sont composés d'actine provenant de la plaque cuticulaire alors que kinocil, en tant que véritable cil primaire, est composé de microtubules émanant du centriole mère. Les stéréocils sont connectés entre eux via des protéines extracellulaires formant les liens apicaux

Bien que le kinocil n'intervienne pas directement dans la perception du signal sonore, son altération affecte le développement de la touffe stéréociliaire et, secondairement, la fonction auditive. Il est à noter que le kinocil des CCs dégénère après la naissance (aux alentours de P10 chez la souris) alors que les autres cellules cochléaires conservent leur cil primaire. Les pathologies résultant d'un défaut de formation, maintenance ou fonction du cil sont appelées ciliopathies et sont fréquemment associées à des pertes auditives (cf. Chapitre 6.1).

4. Les cellules souches

4.1. Embryogenèse précoce

Chez les mammifères, le développement embryonnaire débute par la fusion des gamètes mâle et femelle en une cellule unique appelée zygote. Immédiatement après la fécondation, le zygote entreprend l'étape de segmentation au cours de laquelle il effectue une série de divisions cellulaires le menant au stade de morula (16 cellules) puis de blastocyste (64 cellules). Déjà au stade de blastocyste, la spécification cellulaire est présente : certaines cellules composent le trophoctoderme et seront à l'origine des annexes embryonnaires, alors que d'autres constituent la masse interne destinée à former l'embryon lui-même (Shahbazi and Zernicka-Goetz, 2018). Les cellules de la masse interne prolifèrent pour donner lieu à l'endoderme primitif, remplacé plus tard par l'endoderme définitif, ainsi qu'à l'épiblaste (Figure 7). Les cellules de l'épiblaste ont la remarquable capacité de générer les trois feuillets embryonnaires (l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme) et donc l'intégralité des cellules du corps : elles sont dites pluripotentes. C'est également à ce stade E4.5 chez la souris et E7 chez l'homme que l'embryon va s'implanter dans la muqueuse utérine et se connecter aux vaisseaux sanguins de l'endomètre (Pfeffer, 2018; Shahbazi and Zernicka-Goetz, 2018).

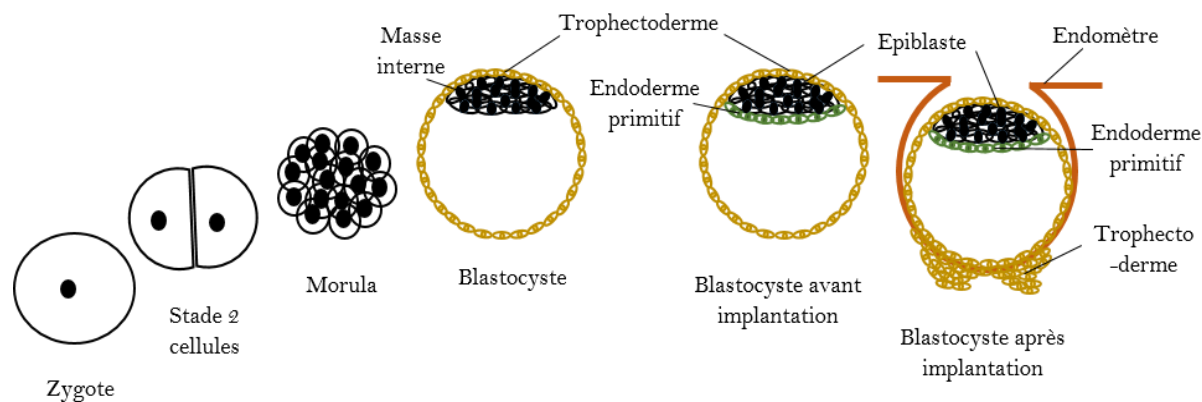


Figure 7 : Embryogenèse précoce. La fusion des gamètes mâle et femelle aboutit à la formation d'une cellule unique, le zygote, qui entame rapidement le processus de segmentation au cours duquel elle va se diviser plusieurs fois sans que le volume total n'augmente. Lorsque les cellules atteignent le nombre de 16, on parle de morula alors que le stade 64 cellules est appelé blastocyste. On retrouve au sein du blastocyste précoce deux sous-populations cellulaires : les cellules pluripotentes de la masse interne, qui se développeront en embryon, et les cellules du trophoctoderme qui, après l'implantation, envahiront la muqueuse utérine et seront à l'origine des annexes extra-embryonnaires. Représentation inspirée de celle de Thomson et Odorico, 2000.

L'embryon poursuit sa croissance au rythme effréné des divisions cellulaires et de leur spécification. Rapidement, des ébauches d'organes se distinguent et, en moins de trois mois chez l'homme, la majorité des tissus et organes sont formés. Ce tournant développemental est également marqué par un changement de terminologie : à ce stade, l'embryon laisse place au fœtus.

4.2. Les cellules souches embryonnaires

Dès 1981, des cellules souches embryonnaires murines (mESCs) issues de la masse interne de blastocystes avant l'implantation ont été isolées et mises en culture avec succès en présence de fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) non-prolifératifs et de sérum de veau fœtal (Evans and Kaufman, 1981). La découverte du LIF (« Leukemia inhibitory factor ») comme facteur majeur sécrété par les fibroblastes a permis de s'affranchir de la culture sur MEFs (Smith et al., 1988; Williams et al., 1988). Plus tard, il a également été démontré que l'état pluripotent et prolifératif des mESCs pouvait être maintenu grâce à la combinaison d'un inhibiteur de GSK3 (CHIR99021) et d'un inhibiteur de MEK1/2 (PD0325901) (Bain et al., 2007), rendant obsolète l'utilisation du sérum de veau fœtal. Ce milieu est appelé *2i* en raison de l'utilisation de deux inhibiteurs.

Les mESCs issues de blastocystes pré-implantatoires sont dites « naïves », par opposition aux cellules souches post-implantation qualifiées alors de cellules ES « primed » épiblastiques (mEpiSCs) (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). Il est intéressant de noter que les conditions de culture influencent la méthylation de l'ADN des cellules ES et par conséquent leur expression génique (Habibi et al., 2013; Leitch et al., 2013; Marks et al., 2012). Ainsi, les mESCs présentent des caractéristiques transcriptomiques plus proche du stade pré-implantation lorsqu'elles sont cultivées en milieu *2i*/LIF et plus proches du stade épiblastique lorsqu'elles sont en présence de sérum (Boroviak et al., 2015). Plus intéressant encore, la plasticité des mESCs est telle qu'il est possible de passer d'une condition à l'autre, de façon réversible, simplement en changeant de milieu de culture (Joshi et al., 2015; Martin Gonzalez et al., 2016). Néanmoins, il a été récemment démontré que l'inhibition de MEK1/2 induisait à moyen terme une instabilité chromosomique importante. Cette dernière peut être évitée en utilisant un inhibiteur de Src, une protéine située plus en amont de la voie des MAP kinases que MEK1/2, mais au détriment de la naïveté des cellules souches qui se rapprochent alors des cellules épiblastiques (Choi et al., 2017).

Presque 20 ans après la première mise en culture des mESCs, des cellules souches embryonnaires humaines (hESCs) ont pu à leur tour être isolées de la masse interne de blastocystes humains (Thomson et al., 1998). Il est intéressant de souligner que les hESCs possèdent un patron

d'expression génique plus proche des mEpiSCs que des mESC naïves (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007), ce qui expliquerait leur tendance à se différencier spontanément. De plus, le maintien de leur état pluripotent et indifférencié nécessite l'ajout de FGF2 au milieu de culture, et ce même en présence de cellules nourricières telles que les MEFs (Thomson et al., 1998). Les mESC et les hESC diffèrent donc sur plusieurs points.

Bien que les hESC soient issues d'embryons surnuméraires obtenus après fécondation *in vitro*, leur utilisation reste éthiquement problématique. L'émergence des cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC) a permis de concilier la manipulation de cellules souches humaines et ces considérations morales.

4.3. Cellules souches pluripotentes induites

4.3.1. Reprogrammation naturelle

Chez les mammifères, il existe plus de 200 types cellulaires différents exprimant chacun un programme génique spécifique hautement régulé par les remaniements épigénétiques que sont la méthylation de l'ADN et les modifications des histones (Hassler et al., 2016). La reprogrammation est un processus effaçant ces marques épigénétiques et permettant leur réorganisation. Elle a lieu deux fois au cours de l'embryogenèse : lors du développement embryonnaire précoce avant l'implantation et lors de la formation des cellules germinales primordiales (CGP) (Navarro, 2011). La reprogrammation pré-implantatoire du génome paternel est un processus actif se déroulant dans les quelques heures suivant la fertilisation alors que le génome maternel est passivement remodelé lors des premières divisions des blastomères (C. R. Cederroth J.-D. Vassalli S. Nef, 2007). Dans les deux cas, la majorité des gènes parentaux est déméthylée, à l'exception d'une centaine d'entre eux soumis à l'empreinte parentale. La reprogrammation des CGP est, quant à elle, plus large puisqu'elle conduit à la déméthylation globale du génome, y compris des gènes soumis à l'empreinte parentale, ainsi qu'à la réactivation du second chromosome X jusqu'alors inactif dans les cellules femelles (Azim Surani, 2014).

4.3.2. Reprogrammation induite

Puisque la reprogrammation naturelle réinitialise le programme épigénétique de ces cellules, est-il possible d'induire un processus similaire dans des cellules somatiques afin d'accéder à la pluripotence ? Un premier élément de réponse a été apporté en 1962 par le Dr.

Gurdon qui a réussi à obtenir des grenouilles viables après avoir transféré le noyau de cellules intestinales complètement différenciées de têtards dans des ovocytes énucléés de *Xenopus* (Gurdon, 1962). Bien que le pourcentage de réussite ait été de l'ordre de 1.5%, cette découverte indique non seulement que les cellules somatiques possèdent la totalité des informations nécessaires à la formation d'un organisme complet, mais également que l'ovocyte énucléé est capable d'en activer les programmes géniques. Cette technique de reprogrammation par transfert de noyau de cellules somatiques a été appliquée avec succès aux mammifères bien des années plus tard, donnant naissance à la célèbre brebis Dolly en 1996 (Wilmut et al., 1997).

Cependant, ce sont les travaux du Dr. Yamanaka qui ont permis d'élucider les facteurs clés permettant la reprogrammation artificielle sans recourir à l'usage d'ovocytes. En effet, après avoir étudié les gènes impliqués dans le maintien de la pluripotence des ESCs, il isole 4 gènes dont l'expression combinée permet de reprogrammer *in vitro* des fibroblastes embryonnaires ou adultes de souris en cellules souches pluripotentes dites « induites » (miPSCs) : *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* et *c-Myc* (OSKM) (Takahashi and Yamanaka, 2006). Moins d'un an plus tard et toujours grâce à la combinaison de ces 4 gènes, son équipe parvient cette fois à reprogrammer des fibroblastes humains en cellules iPS (Takahashi et al., 2007).

Penchons-nous un peu plus sur ces 4 facteurs de transcription clés. OCT4 est un facteur de transcription exprimé physiologiquement du stade zygote jusqu'à celui de blastocyste pré-implantatoire (Plachta et al., 2011). Bien qu'il ne soit pas nécessaire à l'établissement de la pluripotence au cours du développement embryonnaire précoce, il est essentiel à son maintien (Wu and Schöler, 2014). En effet, en l'absence d'OCT4 les embryons murins sont capables de se développer jusqu'au stade de blastocystes mais les cellules de la masse interne se différencient ensuite massivement en cellules trophoblastiques, interrompant brutalement le développement embryonnaire (Le Bin et al., 2014; Nichols et al., 1998). De manière similaire, sa répression *in vitro* dans les mESCs et hESCs aboutit à la formation de trophoctoderme (Hay et al., 2004; Zafarana et al., 2009). OCT4 est donc impliqué dans plusieurs processus biologiques (*e.g.* différenciation, dédifférenciation et autorenouvellement) qui diffèrent selon son niveau d'expression (Niwa et al., 2000). Il contrôle l'expression de nombreux gènes impliqués dans la pluripotence des cellules ES *in vivo* et *in vitro*.

SOX2 est un gène codant pour un facteur de transcription de la famille SOX (pour « SRY related HMG-box ») exprimé dans les progéniteurs adultes de plusieurs tissus tels que l'estomac, la rétine, les gonades et le cerveau (Arnold et al., 2011; Episkopou, 2005; Kempfle et al., 2016; Surzenko et al., 2013). Au cours du développement embryonnaire, il est présent dans

les cellules pluripotentes de la masse interne et de l'épiblaste mais également dans les cellules multipotentes des annexes extra-embryonnaires (Avilion et al., 2003). OCT4 et SOX2 s'associent pour former un complexe constituant un des principaux régulateurs de la pluripotence et de l'autorenouvellement des cellules ES (Avilion et al., 2003; Nichols et al., 1998).

KLF4, un membre de la famille des facteurs de transcription Krüppel, est une protéine à doigt de zinc impliquée dans l'augmentation de l'expression du gène *p53* suite à des dommages à l'ADN (Yoon et al., 2003). Il est également connu pour maintenir la pluripotence et l'autorenouvellement des cellules ES via l'activation de l'expression de NANOG. Ce dernier est un facteur de transcription essentiel au maintien de l'état indifférencié et à la pluripotence des cellules souches aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). Son invalidation au cours du développement embryonnaire murin (*Nanog* *-/-*) ne semble pas empêcher la formation de cellules pluripotentes au sein de la masse interne du blastocyste mais provoque leur différenciation immédiate en endoderme extra-embryonnaire. De même, sa répression induite par ARN interférant dans les mESCs et hESCs en culture entraîne leur différenciation en trophoctoderme et en endoderme primitif suite à une augmentation de l'expression de *GATA4* et *6* (Hyslop et al., 2005; Stewart et al., 2006), alors que sa surexpression soutient leur état indifférencié en absence de cellules nourricières (Chambers et al., 2003).

C-MYC est un proto-oncogène codant pour une phosphoprotéine nucléaire qui interagit avec des dizaines de cofacteurs différents, assurant de cette façon la régulation de centaines de gènes impliqués dans de nombreux processus biologiques (e.g. le remodelage de la chromatine, l'autorenouvellement des cellules souches et la différenciation cellulaire) (revus dans Conacci-Sorrell, McFerrin, and Eisenman 2014; Hann 2014).

Si ces facteurs ont la compétence d'effacer le programme identitaire de la cellule somatique et d'activer le programme de pluripotence, c'est grâce à leur caractère pionnier (Soufi et al., 2012, 2015). Les facteurs transcriptionnels pionniers sont en effet capables de se lier à la chromatine même lorsque son agencement est défavorable (Liu and Kraus, 2017). Ils recrutent ensuite des protéines impliquées dans le remodelage chromatinien afin de modifier l'accessibilité de l'entièreté du génome aux autres facteurs de transcription et modulateurs épigénétiques (Shakya et al., 2015). Ces derniers sont responsables de l'établissement de nouvelles régions régulatrices fonctionnelles, et donc de la constitution d'un nouveau programme identitaire.

Il est intéressant de souligner que c-MYC n'est pas strictement nécessaire à la reprogrammation mais amplifie les effets des OSK en favorisant l'élongation transcriptionnelle via la régulation positive de l'ARN polymérase II (Papp and Plath, 2013). Les mécanismes moléculaires ne sont pas encore totalement élucidés, mais il semblerait que KLF4 agisse en amont du processus, via l'activation de la transcription d'*OCT4*, *SOX2* et *NANOG* (Kim et al., 2008). Ces derniers régulent alors leur propre expression ainsi que celle de nombreux autres gènes menant notamment à une augmentation des niveaux de HDAC1, une enzyme impliquée dans la déacétylation des histones, ainsi qu'au désengagement des facteurs de transcription (clairance de leur promoteur) impliqués dans l'application du programme génique de la cellule somatique en cours de reprogrammation (Chronis et al., 2017). Si cette répression des gènes somatiques est plutôt rapide et efficace, l'activation du programme de pluripotence est plus difficile et constitue une des étapes limitant le rendement de la reprogrammation induite (Apostolou and Stadtfeld, 2018). En effet, l'accessibilité d'OSKM aux régions gérant la pluripotence cellulaire est faible et nécessite une réorganisation de l'architecture chromatinienne. Cela peut mener à une reprogrammation incomplète et donc inefficace. L'apoptose couramment induite par la surexpression de C-MYC (Kim et al., 2018) ainsi que l'entrée en sénescence ou en apoptose des cellules exprimant fortement p53 suite à l'accumulation de dommages à l'ADN (Banito et al., 2009) diminuent également le taux de reprogrammation.

La protéine p53, bien connue pour son rôle dans la sortie du cycle cellulaire et l'entrée en apoptose en réponse à des dommages irréparables de l'ADN, a été plus récemment étudiée pour ses implications dans l'autorenouvellement, la différenciation et la reprogrammation (Spike and Wahl, 2011). Son inhibition totale dans les fibroblastes murins et humains semble faciliter la reprogrammation en iPSCs mais réduit l'entrée en apoptose des cellules à l'ADN endommagé, aboutissant à une instabilité génomique importante (Brosh et al., 2013; Marión et al., 2009). Une approche plus modérée réduisant temporairement l'expression de p53 dans les fibroblastes grâce à l'utilisation de shRNA (Rasmussen et al., 2014) ou siRNA (Kawamura et al., 2009) permet d'obtenir les mêmes effets positifs sur l'efficacité de reprogrammation tout en maintenant un niveau basal de p53 suffisant pour assurer son rôle dans l'induction de l'apoptose.

L'ajout de certaines molécules telles que la vitamine C ou des inhibiteurs de la méthylation de l'ADN et de la déacétylation des histones permet également d'accroître jusqu'à 100 fois l'efficacité de reprogrammation. La vitamine C, un antioxydant bien connu, est capable

de piéger les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites en grande quantité au cours de la reprogrammation et d'en diminuer les effets délétères (Esteban et al., 2010). En outre, elle est nécessaire pour garantir l'activité de certaines dioxygénases impliquées dans les modifications épigénétiques (Esteban et al., 2010). La vitamine C contribuerait ainsi à réguler l'expression de certains gènes de pluripotence soumis à empreinte parentale (Stadtfeld et al., 2012). Les inhibiteurs de la méthylation de l'ADN ainsi que les inhibiteurs de HDAC influencent l'état de la chromatine et donc l'accessibilité des gènes cibles de OSKM. Si plusieurs composés s'avèrent efficaces tels que la 5-azacytidine, le SAHA (« suberoylanilide hydroxamic acid ») et la trichostatine A, le plus efficace reste à ce jour l'acide valproïque (VPA pour « Valproic acid ») (Huangfu et al., 2008).

4.4. Mécanismes moléculaires impliqués dans le maintien de la pluripotence et de l'autorenouvellement

Les cellules souches, qu'elles soient ES ou iPS, partagent les mêmes caractéristiques principales que sont l'autorenouvellement illimité *in vitro* et l'aptitude à se différencier en n'importe quel type cellulaire issus des 3 feuillets embryonnaires. Le maintien de ces facultés est complexe et repose sur de nombreux facteurs intrinsèques et extrinsèques.

4.4.1. Les facteurs intrinsèques

Le maintien de la pluripotence et de l'autorenouvellement des cellules souches est basé sur la modulation d'un réseau de gènes encore largement méconnu. Néanmoins, la communauté scientifique s'accorde sur le rôle clé de trois facteurs de transcription : NANOG, OCT4 et SOX2. Ce trio active et réprime plusieurs centaines de gènes, modulant de nombreux processus biologiques différents dont le remodelage de l'ADN, les modifications épigénétiques, l'inhibition de la différenciation en endoderme, mésoderme, ectoderme et en structures extra-embryonnaires ainsi que le maintien de la pluripotence, l'autorenouvellement et la survie cellulaire (Boyer et al., 2005; Kim et al., 2008). La reprogrammation en cellules iPS nécessite d'ailleurs la modulation directe et indirecte de ces trois gènes clés (chapitre 4.3.2). Il est à noter que ces facteurs partagent de nombreuses cibles dont ils co-occupent les promoteurs.

4.4.2. Les facteurs extrinsèques

Plusieurs facteurs extrinsèques, sécrétés par les cellules nourricières, soutiennent la pluripotence et l'autorenouvellement des cellules souches murines et humaines *in vitro*. La

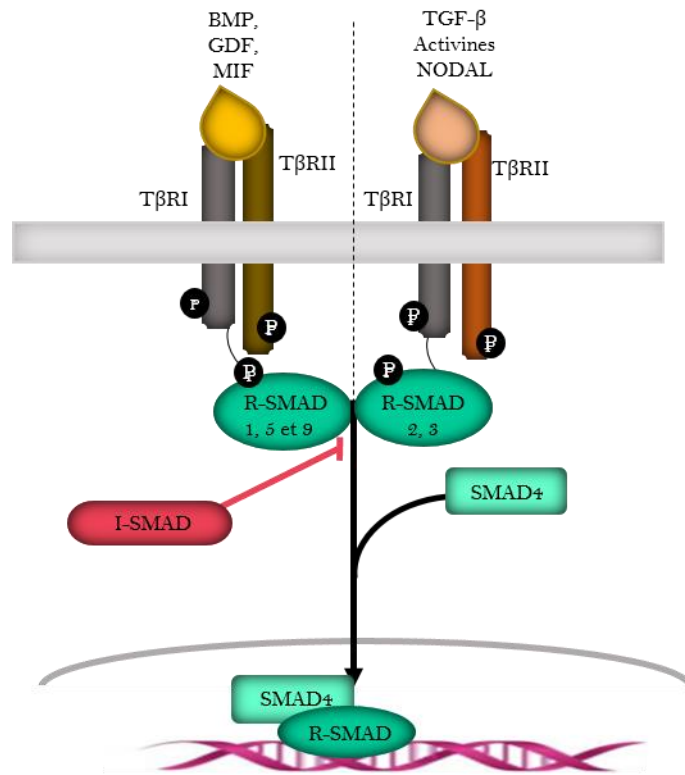
découverte des voies de signalisation modulées par ces facteurs ont permis de s'affranchir des cellules nourricières mais également d'offrir des conditions de culture plus reproductibles et contrôlées grâce à l'utilisation de diverses molécules modulant ces mêmes voies de signalisation. Il est important de souligner que, comme pour les facteurs intrinsèques, tout déséquilibre dans les niveaux de facteurs exogènes mène à la différenciation des cellules souches.

◆ TGF- β

La superfamille des ligands TGF- β regroupe plus de 35 cytokines parmi lesquelles les formes 1, 2 et 3 de TGF- β , l'activine, Nodal, les BMP (pour « Bone Morphogenetic Proteins »), les GDF (pour « Growth Differentiation Factors ») et MIF (pour « Mullerian Inhibitory Factor ») (Lifshitz and Frenkel, 2013). Il existe 12 récepteurs principaux possédant un domaine sérine/thréonine kinase du côté C-terminal : 7 récepteurs de type I (T β RI) et 5 récepteurs de type II (T β RII) (Link and Xiao, 1998). Lors de l'activation de la voie (Figure 8), le ligand se fixe aux récepteurs. T β RII phosphoryle alors le domaine kinasique de T β RI, ce qui entraîne son activation et secondairement la phosphorylation de substrats cytoplasmiques, principalement les protéines SMADs (Mak et al., 2006). Au nombre de 8, elles se divisent en trois catégories : les SMAD régulées par les récepteurs ou R-SMAD (SMAD 1, 2, 3, 5 et 8), la SMAD co-médiatrice (SMAD4) et les SMAD inhibitrices (I-SMAD 6 et 7). Les R-SMAD phosphorylées par T β RI se complexent à SMAD4 avant d'être transloquées dans le noyau où elles interagissent avec d'autres protéines pour réguler les gènes ciblés par la voie TGF- β . Les SMAD inhibitrices sont en compétition avec les R-SMAD pour se lier aux récepteurs T β RI et II, dont elles entraînent la dégradation (Shi and Massagué, 2003).

Selon les ligands impliqués, la voie TGF- β se subdivise en deux catégories : la voie BMP/GDF/MIF et la voie TGF- β /Activine/Nodal. La voie BMP/GDF/MIF fait intervenir les R-SMAD 1, 5 et 9 alors que la voie TGF- β /Activine/Nodal implique les R-SMAD 2 et 3. La voie TGF- β intervient dans la majorité des processus biologiques (*e.g.* croissance cellulaire, différenciation, migration, adhésion, etc.) (Lifshitz and Frenkel, 2013). Le résultat de son activation est contextuel et dépend des gènes régulés. Son implication au cours de l'embryogenèse n'est plus à prouver, notamment au cours de la différenciation des 3 feuilletts embryonnaires et de l'établissement des axes du corps (Gatherer et al. 1990; Millan et al. 1991; Nawshad et al. 2005; Pelton et al. 1991; Roberts et al. 1988; Roberts and Sporn 1992; M. Y. Wu and Hill 2009). La voie TGF- β /Activine/Nodal est fondamentale pour la

maintenance de l'état indifférencié et pluripotent des hESCs (James et al., 2005; Sato et al., 2003). Notamment, les hESCs expriment Nodal et cette expression diminue lors de leur différenciation. De plus, son expression forcée inhibe la différenciation et impose le maintien de la pluripotence alors que l'inhibition de la voie TGF- β par le blocage spécifique d'ALK5 (un récepteur de type T β RI) grâce au SB431542 induit la différenciation des hESCs (Vallier and Pedersen, 2005). Il est possible de cultiver les hESCs indifférenciées en l'absence de cellules nourricières en combinant LIF, TGF- β 1 et FGF2 (Amit et al., 2004). De même, l'activation de la voie BMP semble agir de concert avec le LIF pour promouvoir l'autorenouvellement et la pluripotence des mESCs (Hollnagel et al., 1999; Ying et al., 2003).



Activation des gènes cibles

- Arrêt du cycle cellulaire
- Apoptose
- Prolifération
- Angiogenèse

Figure 8 (page précédente) : Schématisation de la voie de signalisation TGF- β . La voie TGF- β se subdivise en deux catégories selon les ligands impliqués : la voie BMP/GDF/MIF et la voie TGF- β , Activines et NODAL. Suite à la liaison du ligand aux récepteurs, ces derniers phosphorylent des protéines cytoplasmiques de la catégorie des R-SMAD (SMAD régulées par les récepteurs). Les R-SMAD phosphorylées interagissent alors avec la protéine co-médiatrice SMAD4 avant de rejoindre le noyau où elles activent la transcription des gènes cibles. De cette façon, la voie TGF- β intervient dans de nombreux processus biologiques tel que le cycle cellulaire, la prolifération, l'angiogenèse et l'apoptose.

◆ WNT / β -caténine

La voie de signalisation Wnt se subdivise en trois axes : la voie canonique Wnt/ β -caténine et les voies non-canoniques PCP et Wnt/ Ca^{2+} . Nous discuterons ici de la voie la plus largement impliquée dans l'autorenouvellement et la pluripotence des cellules souches : la voie Wnt/ β -caténine.

Les effets transcriptionnels résultant de l'activation de la voie Wnt/ β -caténine nécessitent dans un premier temps l'accumulation de la β -caténine dans le cytoplasme et dans un second temps sa translocation dans le noyau. La β -caténine est liée de manière constitutive à un complexe protéique composé de diverses protéines dont l'axine et APC (pour « Adenomatous Polyposis Coli »), deux protéines d'échafaudage, ainsi que GSK3 et CK1, deux protéines kinases (Figure 9). La phosphorylation de la β -caténine par ce complexe entraîne sa reconnaissance par l'ubiquitine-ligase E3 Trcp et sa dégradation par le protéasome, prévenant ainsi son accumulation cytoplasmique. La liaison d'un ligand Wnt au récepteur Frizzled et au corécepteur LRP5/6 provoque le recrutement de la protéine d'échafaudage Dishevelled (Dsh) qui mobilise à son tour l'axine, GSK3 et CK1. La phosphorylation de LRP5/6 par GSK3 et CK1 accroît sa capacité de liaison à ces protéines et à l'axine. De plus en plus de protéines initialement impliquées dans le complexe de dégradation de la β -caténine se retrouvent mobilisées ailleurs, ce qui aboutit à l'accumulation cytoplasmique de la β -caténine et, *in fine*, à sa translocation nucléaire. Une fois dans le noyau, elle interagit avec les facteurs de transcription TCF/LEF et met fin à la répression de leurs gènes cibles (MacDonald et al., 2009).

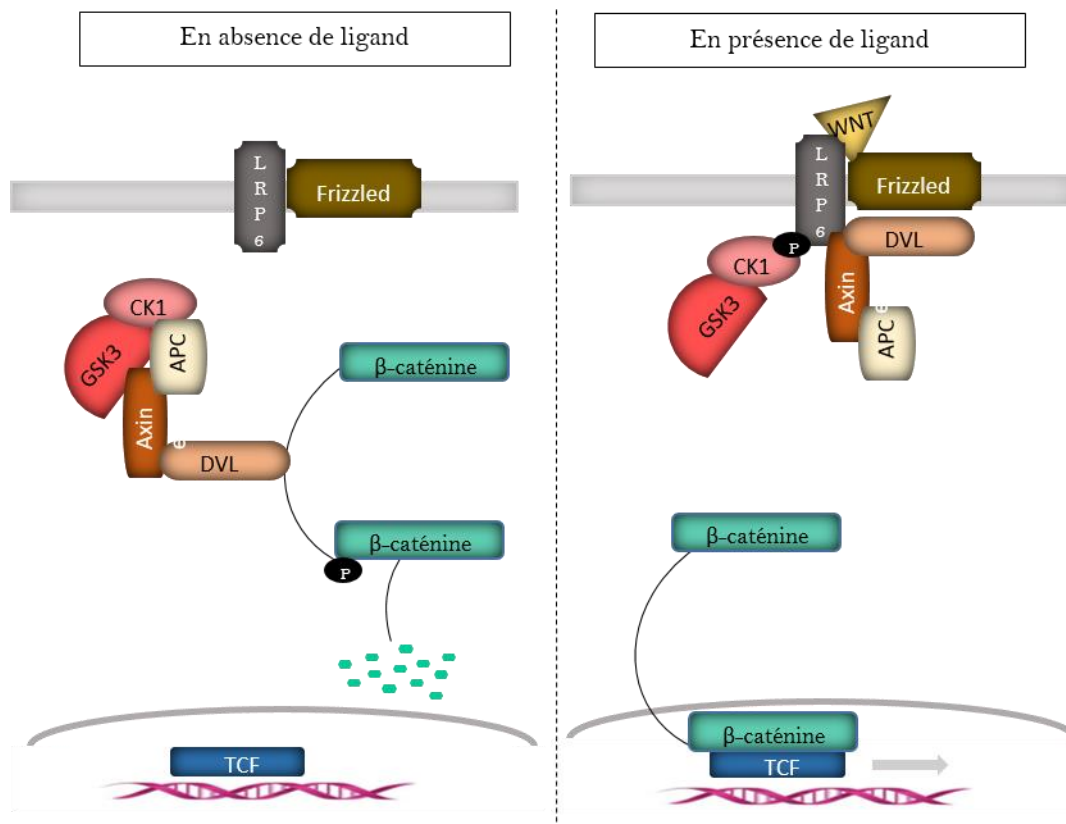


Figure 9 : Schématisation de la voie de signalisation WNT/ β -caténine. En condition basale, la β -caténine est liée de façon constitutive à un complexe protéique composé de l'APC, l'Axine, GSK3, CK1 et DVL. Ce complexe protéique assure la phosphorylation de la β -caténine qui est alors reconnue par une ubiquitine ligase et dégradée par le protéasome. Lorsque le ligand WNT se lie aux récepteur Frizzled et co-récepteur LRP5/6, la protéine DVL est recrutée et entraîne le complexe protéique jusqu'aux récepteurs, qui sont alors phosphorylés par GSK3 et CK1. L'accumulation du complexe aux récepteurs libère la β -caténine qui est alors libre d'aller lever la répression des gènes cibles de la voie Wnt dans le noyau cellulaire.

A ce jour, une vingtaine de ligands sécrétés et plus d'une dizaine de récepteurs de la voie Wnt ont été découverts. Leur expression dynamique et parfois redondante alliée à leur caractère morphogène rend l'étude des rôles de la voie Wnt délicate. Sujet de très nombreuses revues, elle a été démontrée comme essentielle à l'établissement de l'axe antéro-postérieur, à la spécification cellulaire et tissulaire au cours de l'embryogenèse, mais a également été associée à la prolifération, la migration cellulaire et certains cancers (Clevers, 2006; Muñoz-Descalzo et al., 2015; Reya and Clevers, 2005; Serio, 2014; Wu and Schöler, 2014). Dans le domaine des cellules ES, la voie canonique Wnt est décrite comme soutenant le maintien de la pluripotence. Ainsi, l'activation de la voie Wnt suite à l'inhibition de GSK3 couplée à l'inhibition de MEK permet de garder les mESCs à un stade naïf (cf. Chapitre 4.1) (Choi et

al., 2017; Ying and Smith, 2017). L'activation de la voie Wnt régule positivement l'expression d'Oct4 et de Nanog (Sato et al., 2003). De façon similaire, les hESCs peuvent être maintenues indifférenciées en culture lorsque les voies Wnt et FGF sont activées (Lu et al., 2006). Ses effets sont, comme pour la voie TGF- β , dépendants du contexte cellulaire.

◆ FGF :

La voie des facteurs de croissance des fibroblastes (FGF pour « Fibroblast Growth Factor ») regroupe 22 ligands et 4 récepteurs FGFR (Sarabipour and Hristova, 2016). La majorité des ligands FGF sont sécrétés et interagissent avec des cofacteurs modulant leur activité. Ainsi, l'affinité et la spécificité des FGF canoniques pour leurs récepteurs sont modulés par l'héparane sulfate (Ornitz, 2000), un protéoglycan qui limite la diffusion des FGF dans la matrice extracellulaire et permet leur concentration localisée. En réponse à la fixation du ligand (Figure 10), le récepteur s'autophosphoryle avant de phosphoryler différents messagers secondaires permettant l'activation des voies RAS-MAPK, PI3K-AKT, PLC γ et STAT (Ornitz and Itoh, 2015).

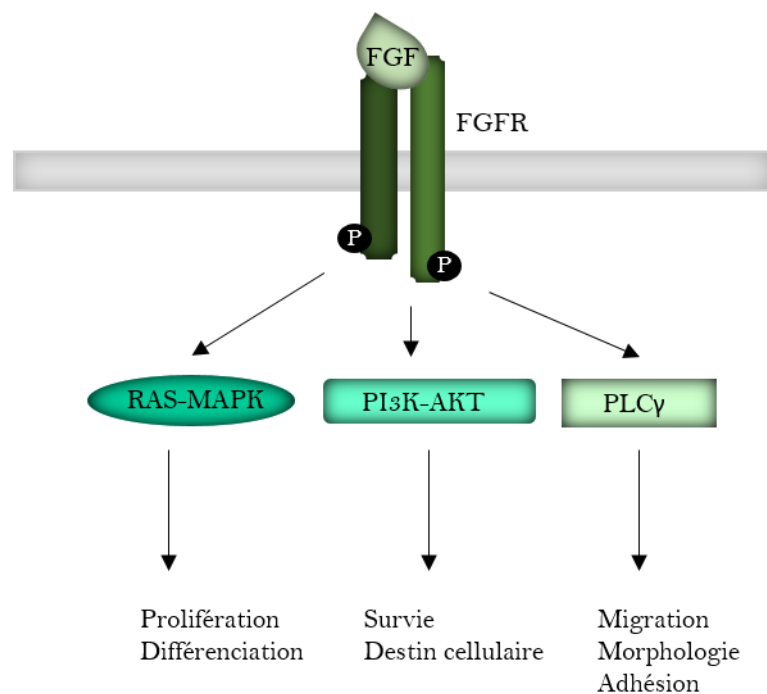


Figure 10 : Schématisation de la voie de signalisation FGF. La liaison d'un ligand aux récepteurs FGFR entraîne l'autophosphorylation de ces derniers. Ils phosphorylent ensuite plusieurs protéines cibles permettant l'activation des cascades moléculaires RAS-MAPK impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire ; PI3K- AKT impliquée dans la survie et le destin cellulaire ; PLC γ impliquée dans la migration, la morphologie et l'adhésion des cellules.

Au cours de l'embryogenèse précoce, la voie des FGF module la différenciation des cellules souches de la masse interne en cellules épiblastiques (Krawchuk et al., 2013; Yamanaka et al., 2010). Bien que l'utilisation de FGF2 dans les milieux de culture de mESCs et hESCs soit communément admise pour maintenir leur pluripotente, les mécanismes sous-jacents ne sont pas encore clairs. Il semble que dans les cellules hESCs, la voie FGF active l'expression de NANOG en coopération avec SMAD2/3 (Greber et al., 2007; Li et al., 2007b). Elle supporterait également l'autorenouvellement des hESC (Ware et al., 2014) et favoriserait la sécrétion d'IGF2 par les cellules nourricières (Bendall et al., 2007).

5. Différenciation des cellules souches en cellules ciliées

5.1. Différenciation des mESCs

Plusieurs protocoles de différenciation en CCs s'étendant sur une période de 18 à 30 jours ont été mis au point et publiés au cours des 15 dernières années (Figure 11). Ils consistent tous en une première étape de culture en condition non-adhérente qui favorise leur agrégation en structures appelées corps embryoïdes (EBs pour « Embryoid bodies »). L'organisation des cellules en EBs promeut la sécrétion de divers facteurs méconnus qui enclenchent la différenciation vers le destin ectodermique. Cette formation d'ectoderme peut être soutenue par l'ajout de plusieurs molécules telles que des inhibiteurs des voies de signalisation TGF- β et Wnt ou de l'IGF-1 (pour « Insulin-like Growth Factor 1 ») (Li et al., 2003; Oshima et al., 2010b; O uji et al., 2012, 2017; Taura et al., 2014). Les cellules ectodermiques sont ensuite engagées vers un destin otique grâce à l'activation de la voie de signalisation des FGF, entraînant une augmentation détectable des niveaux d'expression de plusieurs marqueurs spécifiques de la placode otique tels que Pax2, Pax8 et Six1 (Li et al., 2003; Oshima et al., 2010b; O uji et al., 2012, 2017; Taura et al., 2014). Plusieurs possibilités existent ensuite pour dériver ces progéniteurs otiques en CCs. La plus simple consiste à priver les cellules de tout facteur de croissance exogène (incluant le sérum) et est suffisante pour observer des cellules exprimant Myo7a et Espine, deux marqueurs de CCs (Li et al., 2003). La co-culture des progéniteurs otiques avec des cellules stromales de diverses origines permet d'obtenir des CCs arborant à leur surface apicale une touffe stéréociliaire fonctionnelle (Oshima et al., 2010b; O uji et al., 2012; Taura et al., 2014; Yoshikawa and O uji, 2016).

Malheureusement, ces protocoles n'aboutissent qu'à une faible proportion de CCs, vraisemblablement par le manque de similarités avec les processus biologiques impliqués dans le développement embryonnaire de l'oreille interne. En effet, l'émergence d'un protocole tentant d'en

reproduire autant que possible les étapes clés a permis d'augmenter drastiquement le nombre de CCs obtenues à partir de mESCs (Abboud et al., 2016; Koehler et al., 2013; Koehler and Hashino, 2014; Longworth-Mills et al., 2016). Comme pour les autres protocoles, les mESCs sont cultivées de manière à générer des EBs. Elles sont ensuite exposées à du BMP4 et au SB431542 (un inhibiteur de la voie TGF- β) afin d'orienter la différenciation vers le NNE. L'ajout d'un inhibiteur de BMP (LDN-193189) permet alors l'émergence de la PPR qui, en présence de FGF2, dérivera en cellules de l'OEPD. Finalement, les agrégats sont laissés une douzaine de jours en condition non-adhérente encourageant l'auto-organisation cellulaire dans un milieu de maturation contenant un activateur de la voie Wnt (CHIR99021). A la fin de ce processus, les agrégats contiennent non seulement plus de 1500 CCs fonctionnelles, mais également des cellules de soutien et des neurones, démontrant l'importance de l'auto-organisation et des interactions entre plusieurs types cellulaires au cours de la différenciation.

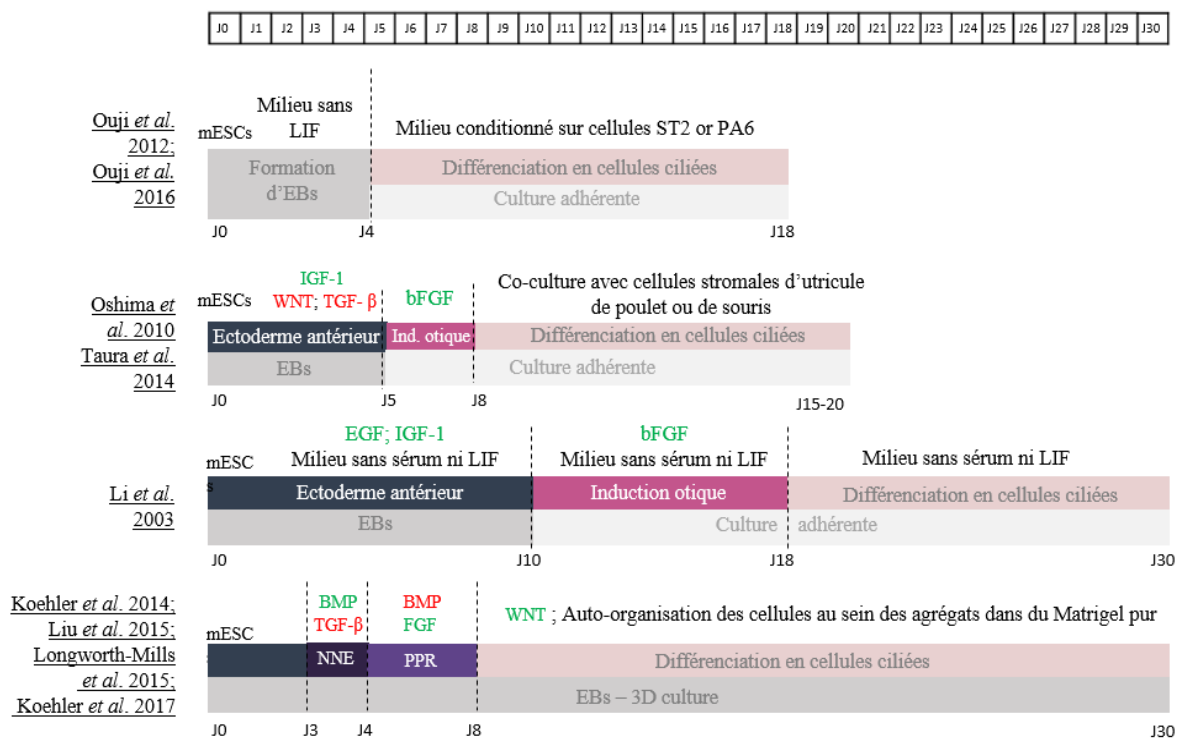


Figure 11 : Comparaison des protocoles de différenciation des mESCs en cellules ciliées. BMP: Bone Marrow Protein; EB: embryoid bodies; EGF: Epidermal Growth Factor; FGF: Fibroblast Growth Factor; hESCs: human Embryonic Stem Cells; hiPSCs: human induced Pluripotent Stem Cells; IGF-1: Insulin like Growth Factor 1; LIF: leukemia inhibitory factor; NNE: Non Neural Ectoderm; OEPD: Otic Epibranchial Placode Domain; PPR: PrePlacodal Region ; RA: Retinoic Acid; TGF- β : Transforming Growth Factor beta.

Il est intéressant de souligner que les mESCs étant faciles à obtenir et à maintenir en culture, l'utilisation des miPSCs n'apporte aucun avantage, ce qui explique le peu de travaux de différenciation en CCs à partir de ces cellules.

5.2. Différenciation des hESCs et hiPSCs

Deux stratégies distinctes ont été développées afin de différencier les hESCs et hiPSCs en CCs : l'une induisant directement la formation de progéniteurs otiques, l'autre passant par les stades intermédiaires de NNE et de PPR.

Les progéniteurs otiques sont efficacement dérivés directement des hESCs et hiPSCs suite à l'activation de la voie des FGF. Il est important de souligner que ces progéniteurs sont composés en réalité de deux sous-populations spécifiques : les progéniteurs otiques neuronaux (PONs) et les progéniteurs otiques épithéliaux (POEs) (Chen et al., 2012; Ding et al., 2016). Il est possible d'enrichir les cultures en un sous-type de progéniteurs grâce à des dissociations séquentielles et des conditions de culture privilégiant la prolifération cellulaire. Lorsque les POEs sont exposés à de l'acide rétinoïque (RA) combiné à de l'EGF, deux facteurs connus pour promouvoir la différenciation en CCs dans la cochlée de mammifères, des cellules exprimant plusieurs marqueurs de CCs comme ATOH1, POU4F3 et MYO7A sont générées (Chen et al., 2012; Ding et al., 2016). L'absence de touffe stéréociliaire à leur surface apicale démontre cependant l'incapacité de ces facteurs à activer – seuls – le programme nécessaire à la maturation des CCs. *A contrario*, ils entraînent la différenciation en cellules arborant des stéréocils fonctionnels lorsque leur utilisation est combinée à de la co-culture avec des cellules stromales d'utricule de poulet (Chen et al., 2016; Ding et al., 2016; Tang et al., 2016), démontrant une fois de plus la capacité des cellules stromales utriculaires à sécréter des facteurs essentiels au développement de CCs. Ajouter au protocole une étape d'induction en PPR avant la différenciation en progéniteurs otiques aboutit au même résultat, à savoir la formation de CCs fonctionnelles mais peu nombreuses (Ohnishi et al., 2015).

Comme dans le cas des mESCs, la différenciation des hESCs et hiPSCs en CCs est grandement améliorée lorsque le protocole appliqué se rapproche du développement embryonnaire. Ainsi, l'émergence du NNE est rendue possible par les inhibitions combinées des voies TGF- β et Wnt (Ealy et al., 2016; Ronaghi et al., 2014), mais semble plus efficace lorsque l'inhibition de la voie TGF- β est couplée à l'activation des voies FGF et BMP (Koehler et al., 2017). De plus, s'il est clair que l'activation de la voie FGF est nécessaire à l'induction de la PPR (Ealy et al., 2016; Koehler et al., 2017; Ronaghi et al., 2014), l'ajout de RA (Ealy et al., 2016) ou

d'un inhibiteur de la voie BMP (Koehler et al., 2017) en accroît le rendement. Au cours du développement embryonnaire, une activation transitoire de la voie Wnt est nécessaire à la genèse des précurseurs de la placode otique. Cette étape peut être récapitulée *in vitro* (Koehler et al., 2017). Finalement, le maintien des cellules en culture non-adhérente dans un milieu de maturation sur une période de plusieurs mois suffit à la formation de structures complexes comprenant plusieurs types cellulaires parmi lesquels des cellules de soutien, un grand nombre de CCs fonctionnelles ainsi que des neurones venant connecter ces dernières pour former des synapses à ruban spécifiques des organes sensoriels (Koehler et al., 2017). *A contrario*, l'activation des voies FGF et BMP échoue à engendrer de tels résultats (Ronaghi et al., 2014), même en cas d'activation de la voie Wnt (Ealy et al., 2016). L'ensemble de ces résultats tend à prouver que la différenciation des cellules souches est un processus complexe qui nécessite la régulation rigoureuse de plusieurs voies de signalisation à des temps précis, mais également que chercher à obtenir des cultures pures de progéniteurs otiques et de CCs est contre-productif. A l'instar de ce qui se déroule naturellement au cours de l'embryogenèse, la formation conjointe d'autres types cellulaires parallèlement aux cellules otiques semble primordiale au succès de la différenciation *in vitro* des cellules souches pluripotentes.

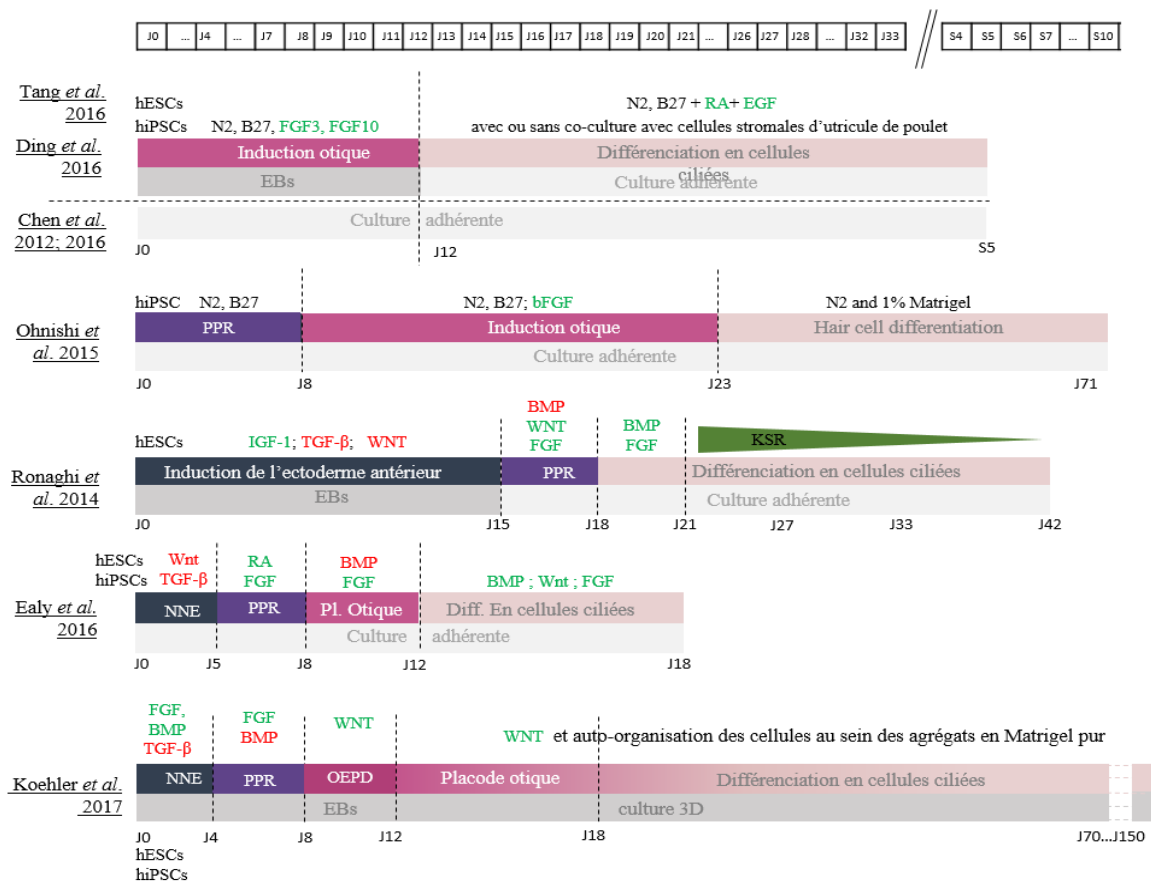


Figure 12 (page précédente) : Comparaison des protocoles de différenciation des cellules souches pluripotentes humaines en cellules ciliées. BMP: Bone Marrow Protein; EB: embryoid bodies; EGF: Epidermal Growth Factor; FGF: Fibroblast Growth Factor; hESCs: human Embryonic Stem Cells; hiPSCs: human induced Pluripotent Stem Cells; IGF-1: Insulin like Growth Factor 1; LIF: leukemia inhibitory factor; NNE: Non Neural Ectoderm; OEPD: Otic Epibranhial Placode Domain; PPR: PrePlacodal Region ; RA: Retinoic Acid; TGF-b: Transforming Growth Factor.

6. Les surdités et déficiences auditives

Les surdités se définissent par une augmentation du seuil audiométrique tonal de plus de 20dB (décibels) au niveau d'une ou des deux oreilles. Elles sont réparties en 4 catégories selon leur degré de sévérité : légères (perte audiométrique moyenne de 20 à 40dB), modérées (entre 41-70dB), sévères (entre 71-90dB) ou profondes (au-delà de 90dB) (Smith et al., 2005). Lorsque la déficience est légère, la plupart des bruits quotidiens sont toujours distingués mais une discussion menée à voix basse ne sera pas entendue. Les déficiences modérées entraînent des difficultés à entendre certains bruits mais une conversation peut être comprise lorsque la voix est élevée. Quand le degré d'atteinte est sévère, seuls les sons forts sont discernés, et seuls les sons graves très puissants sont perçus par les personnes souffrant de surdité profonde, sans qu'elles puissent les identifier.

On distingue également les surdités de transmission et de perception (également appelées neurosensorielles) ; les surdités uni- ou bilatérales ; les surdités syndromiques ou non-syndromiques. Les surdités de transmission sont dues à un défaut de conduction de l'information sonore de l'oreille externe et moyenne vers l'oreille interne, par exemple lorsqu'il y a un corps étranger ou une déformation du canal auditif. Les surdités de perception résultent d'un problème au niveau cochléaire de l'oreille interne alors que les surdités mixtes, comme le laisse supposer leur nom, sont une combinaison des deux. Finalement, lorsque la surdité fait partie d'un ensemble de symptômes affectant d'autres organes, elle est qualifiée de syndromique et représente environ 30% des cas de surdités génétiques (Kalatzis and Petit, 1998).

La multitude des facteurs pouvant aboutir à une déficience auditive en fait un problème de santé majeur pouvant toucher chacun d'entre nous. En effet, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) plus de 466 millions de personnes, dont 34 millions d'enfants, sont directement concernées et ces chiffres ne cessent d'augmenter. Le vieillissement, la surexposition professionnelle ou récréative à des bruits intenses, l'utilisation de médicaments ototoxiques, certaines maladies infectieuses sont autant d'éléments pouvant être à l'origine d'une surdité. Le facteur génétique joue également un rôle important dans les déficiences auditives puisqu'il peut induire une sensibilité et une prédisposition aux surdités acquises. De plus, la moitié des cas de surdités congénitales ont une origine génétique (Nance,

2003). Les gènes impliqués dans les surdités non-syndromiques sont codifiés : DFNA lorsque la transmission est autosomale dominante, DFNB lorsqu'elle est autosomale récessive et DFNX lorsqu'elle est liée au chromosome X. Au-delà de l'impact économique s'élevant à plus de 750 millions de dollars US par an à travers le monde, les surdités non-prises en charge entraînent un isolement social important. Il n'y a actuellement aucun traitement médicamenteux permettant de restaurer l'audition, les soins aux personnes touchées par les déficiences auditives consistant principalement à porter des prothèses auditives ou placer un implant cochléaire (Müller and Barr-Gillespie, 2015).

6.1. Centrosome, cil et surdité

6.1.1. Le centrosome et le cil primaire

Le centrosome est un organe intriguant évoqué dès 1887 par le scientifique belge Edouard Van Beneden (Beneden, 1887) ainsi que par Theodor Boveri (Boveri, 1887). Déjà à cette époque, il est décrit comme une structure entourée de fibres cytoplasmiques qui se duplique au cours de la division cellulaire. Depuis, de très nombreuses études sont venues compléter ces observations et dévoiler peu à peu la complexité insoupçonnée de cette structure à l'apparence simpliste. Aujourd'hui, le centrosome est considéré comme le centre organisateur principal du réseau de microtubules au sein des cellules (MTOC pour « Microtubule organizing center »). En tant que tel, il est à l'origine de l'élaboration du fuseau mitotique dans les cellules en division. Dans les cellules quiescentes, il est appelé corps basal et il sert de point de départ à la synthèse d'une organelle composée de microtubules : le cil primaire.

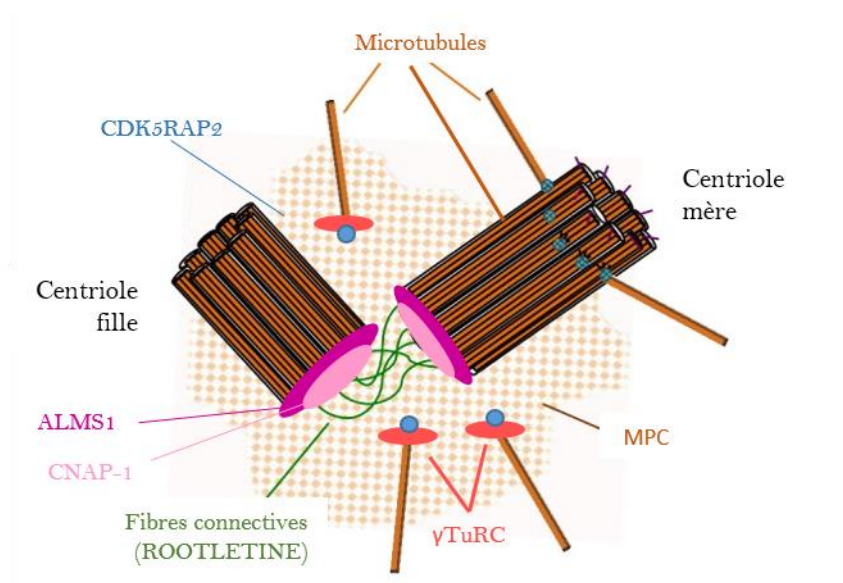


Figure 13 (page précédente) : Structure du centre organisateur des microtubules. Il est composé de deux centrioles (mère et fille) reliées entre elles par des protéines et entourées d'un nuage de fibres protéiques constituant le matériel péricentriolaire (MPC). Au sein du MPC, les complexes γ -TuRC assurent la nucléation des microtubules et sont à l'origine de l'initiation de nouveaux microtubules. Dans les cellules en division, le centre organisateur des microtubules est appelé centrosome et il est impliqué dans la formation du fuseau mitotique. Dans les cellules en quiescence, il migre en bordure cellulaire et s'ancre à la membrane plasmique. Il est alors appelé corps basal et permet l'émergence d'une structure riche en microtubules : le cil. Illustration adaptée d'après Babelanne et al. 2014.

D'un point de vue structurel, le centrosome/corps basal se compose de deux centrioles et du matériel péricentriolaire (MPC) (Figure 13). Les centrioles sont des cylindres composés de 9 triplets de microtubules alors que le matériel péricentriolaire correspond à l'assemblage de centaines de protéines fibreuses s'organisant autour des centrioles. Parmi celles-ci, on retrouve la protéine CDK5RAP2 (plus largement décrite au chapitre 6.3) mais également les complexes γ -TuRC (pour « γ -TUBULIN ring complex ») composés de γ -TUBULINE et de ses partenaires protéiques qui permettent l'initiation de la polymérisation de nouveaux microtubules. Soulignons également que la cohésion centriolaire est assurée par l'ancrage d'un pont de ROOTLETINE aux extrémités des centrioles via la protéine CNAP-1 (Mardin and Schiebel, 2012), elle-même recrutée par ALMS1.

6.1.2. Biogenèse et duplication du centrosome :

Au cours du cycle cellulaire, le centrosome doit se dupliquer pour que chacune des cellules filles puisse hériter d'un centrosome au moment de la division cellulaire (Figure 14). Ce processus s'initie en phase S par le bourgeonnement d'un procentriole, également appelé centriole fille, à la surface de chacun des centrioles mères. La maturation des procentrioles - correspondant à une élongation progressive - s'étend jusqu'en phase G2. Parallèlement, les protéines du MPC s'accumulent. Au cours de la mitose, les centrosomes se séparent. A ce stade, les cellules filles possèdent chacune un centrosome contenant deux centrioles orientés perpendiculairement et accrochés l'un à l'autre. Pour que les cellules puissent à nouveau effectuer un cycle cellulaire, il est primordial que les centrioles se séparent l'un de l'autre suivant un processus appelé « désengagement centriolaire » avant de se repositionner et d'être de nouveau reliés par des connecteurs protéiques (Bettencourt-Dias and Glover, 2007; Nigg, 2007).

Lorsque la cellule entre en quiescence, le centrosome migre en bordure cellulaire pour devenir le corps basal et permettre l'éédification du cil primaire. Chaque nouvelle entrée de la cellule dans le cycle cellulaire s'accompagne d'une résorption progressive du cil primaire qui finit par disparaître. Ces cycles de construction/déconstruction du cil sont possibles grâce au transport intra-flagellaire (IFT pour « Intraflagellar transport ») de nombreuses protéines (Pedersen and Rosenbaum, 2008)

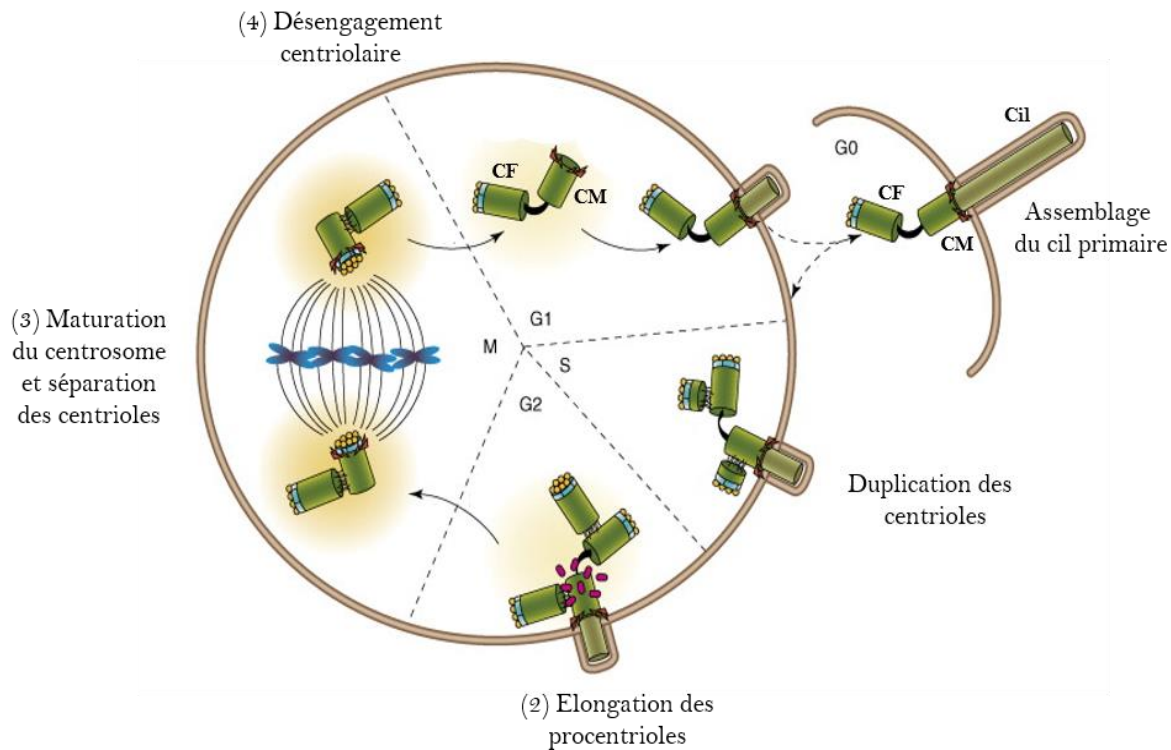


Figure 14 : Biogenèse et duplication du centrosome au cours du cycle cellulaire. Pour que les cellules filles puissent chacune hériter d'un centrosome, le centrosome se duplique au cours du cycle cellulaire. Ce processus s'initie en phase S par le bourgeonnement de procentrioles perpendiculairement aux centrioles existants (1). Les procentrioles s'allongent en phase G2 (2) et les protéines du MPC s'accumulent jusqu'à former deux centrosomes distincts. Au cours de la phase M, ces derniers se séparent (3). Finalement, le procentriole se détache du centriole mère suivant un processus appelé désengagement centriolaire afin de se repositionner (4). Les centrioles sont alors reliés par un pont protéique. Dans les cellules en quiescence, le centrosome migre en bordure cellulaire où il s'ancre à la membrane plasmique pour former le corps basal. Le corps basal est le pied à partir duquel s'érige le cil. CM : centriole mère ; CF : centriole fille. Illustration adaptée de Bettencourt-Dias et al. 2008.

6.1.3. Les fonctions du centrosome

En tant que centre organisateur des microtubules, le centrosome joue un rôle primordial dans l'établissement du cytosquelette cellulaire. Il influence donc la morphologie des cellules et pourrait intervenir notamment dans leur migration (Palesi-Pocachard et al., 2016; Zhang and Wang, 2017). Au cours de la mitose, les centrosomes s'éloignent jusqu'à se placer de part et d'autre du noyau où ils permettent la nucléation et l'élongation des fuseaux mitotiques à partir des pôles. Dès lors, toute anomalie numérique des centrosomes peut affecter la ségrégation des chromosomes et conduire à une instabilité génomique ainsi qu'à la désorganisation cellulaire. L'amplification anormale des centrosomes est régulièrement observée dans les cancers et pourrait contribuer à la progression tumorale (Gönczy, 2015; Levine et al., 2017; Ogden et al., 2017). Toutefois, cette hypothèse fait l'objet de nombreux débats dans la littérature puisque certains considèrent l'aberration centrosomale comme une conséquence plutôt qu'une cause de la pathologie (Coelho et al. 2015; Levine et al. 2017; Vitre et al. 2015). Étonnamment, la perte du centrosome par ablation au laser n'abolit pas la capacité à créer un centre organisateur des microtubules complet et fonctionnel. En effet, il existe une voie secondaire dite « acentriolaire » permettant de s'affranchir de la présence d'un centriole pour générer un fuseau mitotique, mais la moitié des cellules échouent à se diviser et aucune ne parvient à répliquer son ADN au cycle suivant (Doxsey et al., 2005).

Outre son rôle majeur lors de la division, le centrosome influence également la progression du cycle cellulaire grâce au recrutement de nombreuses protéines régulatrices (Conduit et al., 2015). La présence de la protéine AKA450 au sein du MPC serait essentielle au cours de la transition de la phase G1 vers la phase S (Keryer et al., 2003) alors que le recrutement de la kinase CHK1 (pour « Checkpoint Kinase 1») au niveau du centrosome serait, quant à lui, essentiel à la régulation de l'activité du complexe CDK1-CyclineB et la transition G2/M. L'absence de CHK1 au centrosome provoque une entrée en mitose précoce (Krämer et al., 2004). Ainsi, toute anomalie des centrosomes, mais cette fois en termes de composition ou de structure, peut également influencer le nombre de cellules filles produites en agissant sur le cycle cellulaire des cellules en prolifération. De plus, les mutations de gènes codant pour des protéines impliquées dans la duplication et/ou la maturation du centrosome sont à l'origine de pathologies humaines, dont la microcéphalie héréditaire primaire (MCPH). Les patients atteints de MCPH présentent un retard intellectuel de sévérité variable accompagné de retards du développement moteur et linguistique (Verloes et al., 2013) et, dans certains cas, d'une déficience auditive. Ces microcéphalies semblent résulter d'un appauvrissement du nombre de progéniteurs neuronaux au cours du développement cérébral (Bond et al., 2005a; Evans et al.,

2006; Lizarraga et al., 2010a). Parmi les gènes associés à la MCPH se trouve le gène *CDK5RAP2* décrit au chapitre 6.3.

6.1.4. Les fonctions des cils cellulaires non-motiles

L'immense majorité des cellules présentent à leur surface un cil primaire non-motile composé de 9 doublets de microtubules s'organisant en une structure cylindrique dite 9+0. Longtemps considéré comme une organelle vestigiale, le cil primaire est maintenant décrit comme une véritable antenne cellulaire. Il agit non seulement comme un senseur biologique en assurant la détection de signaux extracellulaires, mais il intervient également dans la réponse à ces signaux via la régulation de diverses cascades de signalisation (e.g. Hedgehog, Wnt, PDGF α) (Mukhopadhyay and Rohatgi 2014; Nigg and Raff 2009). Depuis plusieurs années, un lien entre le cil et la polarité cellulaire a été avancé (Hua and Ferland, 2018; Wallingford, 2010), mais les mécanismes moléculaires sous-jacents sont encore largement méconnus. Tandis que certains attribuent au cil un rôle fondateur de polarité, d'autres pensent que la localisation du corps basal et la formation du cil sont instruites par les protéines de polarité (Boutin et al., 2014; Goetz and Anderson, 2010). Comme évoqué au chapitre 3.4, bien qu'il ne soit pas directement impliqué dans la détection du son, le kinocil des cellules sensorielles cochléaires est essentiel à l'organisation de la touffe stéréociliaire sans laquelle la détection des sons n'est pas possible (Falk et al., 2015).

Dans les cellules post-mitotiques, les défauts de positionnement, de genèse, d'élongation ou de la fonction du cil aboutissent à de nombreuses pathologies regroupées sous l'appellation « ciliopathies ». Les manifestations cliniques sont variables d'une ciliopathie à l'autre. Ils peuvent concerner un ou plusieurs tissus et présentent souvent des sévérités différentes selon les individus (Hildebrandt et al., 2011). Certaines d'entre elles comportent des troubles auditifs (Baker and Beales, 2009; Tobin and Beales, 2009; Ware et al., 2011). C'est notamment le cas du syndrome d'Alström.

6.2. Le syndrome d'Alström et le gène *ALMS1*

Le syndrome d'Alström est une maladie monogénique récessive extrêmement rare recensant moins de mille cas à travers le monde depuis sa description en 1959 (Alstrom et al. 1959). Elle résulte de la mutation du gène *ALMS1* (Collin et al., 2002). Les premiers signes cliniques sont des troubles de la vision et une photophobie intense apparaissant quelques semaines à peine après la

naissance. Rapidement, les manifestations de la maladie se font plus nombreuses (Figure 13) : obésité (Marshall et al., 1997), atteintes rénales et hépatiques (Connolly et al., 1991), cardiomyopathie dilatée (Michaud et al., 1996), hyper-insulinémie évoluant fréquemment en diabète de type II, retards mentaux et linguistiques, rétinopathie et surdité neurosensorielle bilatérale progressive (Marshall et al., 1997; Welsh, 2007). Bien que ces atteintes soient caractéristiques de la pathologie, les symptômes et leur intensité varient d'un patient à l'autre indépendamment de la mutation portée par le gène. En effet, même des jumeaux homozygotes affectés par le syndrome d'Alström peuvent présenter une variabilité dans la sévérité de leurs symptômes cliniques (Hollander et al., 2017). L'espérance de vie des patients dépasse rarement les 40 à 50 ans.

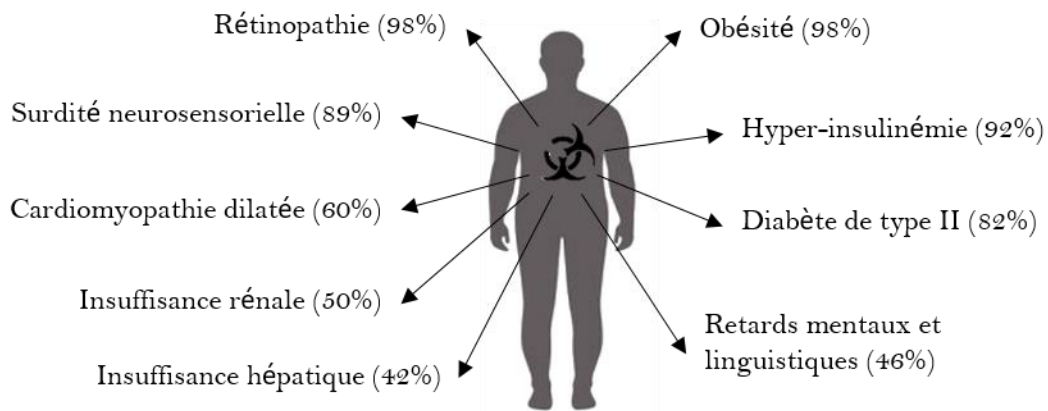


Figure 15 : Schéma reprenant les principales manifestations cliniques du syndrome d'Alström. Les pourcentages de patients présentant chaque symptôme mentionné proviennent d'une étude menée par Marshall en 2005 sur une cohorte de 182 patients.

Le gène *ALMS1* comporte 23 exons et s'étend sur plus de 230 000 paires de bases au niveau du chromosome 2p13 chez l'Homme. L'exon 8 se distingue des autres par 34 répétitions imparfaites d'une courte séquence d'environ 140 paires de bases dont le rôle n'est pas connu. Après épissage alternatif, 4 transcrits sont détectables dans des extraits de cerveaux et testicules (Collin et al., 2002). De très nombreux SNPs (pour « Single-nucleotide polymorphism ») ont également été recensés, ce qui pourrait expliquer en partie la variabilité des symptômes d'un individu à l'autre. A ce jour, plus d'une centaine de mutations du gène *ALMS1* ont été associées au syndrome d'Alström (Marshall et al., 2011). La plupart sont localisées dans les exons 8, 10 et 16 et provoquent un décalage du cadre de lecture, entraînant la production d'un codon stop prématuré (Collin et al., 2005).

ALMS1 est une protéine de 461kDa exprimée au niveau du centrosome et du corps basal de la plupart des cellules humaines (Hearn et al., 2005). Bien que ses rôles ne soient pas encore clairement établis, sa déplétion par petits ARN interférants induit la formation de cils plus courts insensibles aux stimulations mécaniques dans les cellules rénales de souris (Li et al., 2007a). La perte d'ALMS1 s'accompagne d'une diminution de l'expression centriolaire de la protéine C-NAP1 (Knorz et al., 2010) et d'une l'accumulation des récepteurs Notch dans les endosomes tardifs des cellules humaines HEK293 (Leitch et al., 2014). Ces résultats suggèrent un problème de transport et de recyclage dans les cellules déplétées pour ALMS1. Un défaut de transport, bien que léger, a également été observé dans des fibroblastes provenant de patients atteints du syndrome d'Alström (Collin et al., 2012). De plus, les fibroblastes de certains patients présentent un cycle cellulaire plus long, une résistance à l'apoptose et une plus forte adhérence à la matrice extracellulaire (Zulato et al., 2011). Quant à la cardiomyopathie dilatée observée dans certains cas, elle trouve son origine dans l'activité mitotique anormalement élevée des cardiomyocytes mutés (Louw et al., 2014). Il semble donc que la protéine ALMS1 soit impliquée directement ou indirectement dans la régulation du cycle cellulaire, le transport intracellulaire et la ciliogenèse, et que l'impact de sa mutation varie d'un type cellulaire à l'autre, complexifiant l'étude et la compréhension du syndrome d'Alström.

6.3. La microcéphalie autosomale récessive primaire et le gène *CDK5RAP2*

La microcéphalie autosomale récessive primaire (MCPH) est une affection génétique caractérisée par une réduction significative de la circonférence du crâne sans altération majeure des structures cérébrales (Bond et al., 2005a; Issa et al., 2013). Sa prévalence mondiale est très faible, de l'ordre de 1 pour 1 000 000, et la maladie touche plus fréquemment les familles consanguines. A ce jour, les mutations de 11 gènes ont été associés à la MCPH : *MCPH1*, *WDR62*, *CEP152*, *CEP63*, *CEP135*, *ASPM*, *CENPJ*, *STIL*, *CASC5*, *PCM* et *CKD5RAP2*. Soulignons que la grande majorité d'entre eux code pour des protéines centrosomales et que toutes interviennent directement ou indirectement au cours de la mitose (Table 1). Les défauts de prolifération qui s'ensuivent affectent les progéniteurs neuronaux, ce qui cause ultérieurement une réduction significative de la taille du cerveau (Bond et al., 2005b; Lizarraga et al., 2010a; Megraw et al., 2011).

Le gène *CDK5RAP2* (pour « CDK5 regulatory subunit associated protein 2 ») se situe sur le chromosome 9 chez l'Homme (Graser et al., 2007b). Il se compose de 39 exons et est exprimé de façon ubiquitaire (Ching et al., 2000). Son épissage alternatif mène à la production de quatre isoformes protéiques. Les mutations de *CDK5RAP2* entraînent une MCPH chez les patients, et certains cas s'accompagnent de déficience auditive (Pagnamenta et al., 2012).

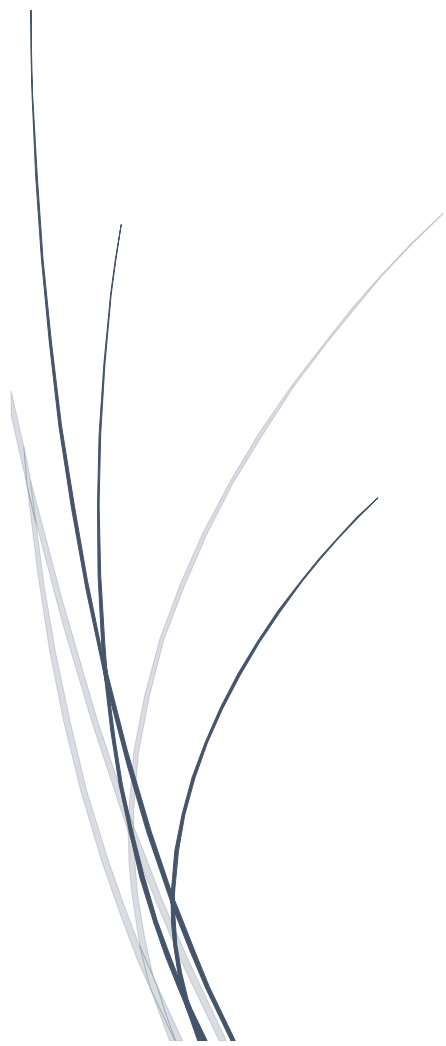
Physiologiquement, la protéine CDK5RAP2 se localise principalement au niveau du centrosome, bien qu'elle ait également été détectée dans l'appareil de Golgi de trois lignées cellulaires différentes (MCF-7, RPE-1 et Hela) (Wang et al., 2010). Si son rôle au niveau de l'appareil de Golgi n'est pas connu, elle a été démontrée comme essentielle à la cohésion entre les centrioles (Graser et al., 2007b). D'un point de vue mécanistique, elle interagit avec d'autres composants du MPC et du centrosome tels que la péricentrine et la γ -tubuline. Plus précisément, elle semble être recrutée par la péricentrine (Graser et al., 2007b) et est nécessaire à l'ancrage des anneaux de tubuline γ -TuRCs (pour « γ -Tubulin Ring Complex »), des complexes protéiques essentiels à la formation des fuseaux mitotiques lors de la division cellulaire (Fong et al., 2008). La déplétion de *CDK5RAP2* par petits ARN interférants dans les cellules HEK293T et U2OS interfère avec la nucléation centrosomique et acentrosomique des microtubules sans affecter l'assemblage des γ -TuRCs, suggérant que CDK5RAP2 intervient dans l'attachement de ces structures au centrosome (Choi et al., 2010).

Table1 : Liste et description des gènes associés à la microcéphalie autosomale récessive primaire

Nom	Nom complet	Localisation	Fonction
MCPH1	Microcephalin	Noyau	Régulateur de la condensation des chromosomes (Trimborn et al., 2004). Maintient la phosphorylation inhibitrice de CDK1, prévenant ainsi une entrée précoce en mitose (Alderton et al., 2006)
WDR62	WD repeat-containing protein 62	Noyau et centrosome	Intervient dans la duplication des centrioles (Kodani et al., 2015)
CEP152	Centrosomal protein, 152kD	Centrosome	Intervient dans la duplication des centrioles et l'organisation du matériel péricentriolaire (Dzhindzhev et al., 2010)
CEP63	Centrosomal protein, 63kD	Centrosome	Recrute CDK1 au niveau du centrosome (Loffler et al., 2011)
CEP135	Centrosomal protein, 135kD	Centrosome	Nécessaire à l'assemblage des centrioles et du corps basal (Carvalho-Santos et al., 2010)

ASPM	Abnormal Spindle-like, Microcephaly-associated	Fuseau mitotique	Essentielle au maintien de l'orientation correcte du plan de clivage permettant les divisions cellulaires symétriques (Fish et al., 2006)
CENPJ = CPAP	Centromeric protein J	Centromère	Régulerait la nucléation et l'assemblage des microtubules (Hung et al., 2000)
STIL	SCL TAL1-interrupting locus	Centrosome	Intervient dans la duplication des centrioles (Vulprecht et al., 2012)
CASC5 = KNL1	Kinetochores Scaffold 1	Kinétochore	Permet l'attachement des microtubules aux centromères des chromosomes (Genin et al., 2012)
PCM1	Pericentriolar material 1	Centrosome	Recrute d'autres protéines au niveau du centrosome (Dammermann and Merdes, 2002)
CDK5RAP2	CDK5 regulatory subunit-associated protein 2	Centrosome	Nécessaire à la cohésion du centrosome (Barrera et al., 2010)

Objectifs



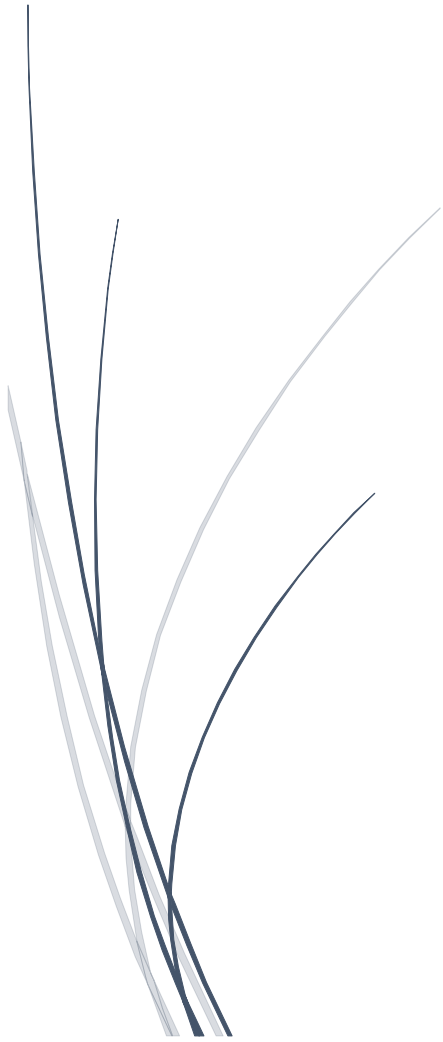
Les objectifs du travail

Les cellules ciliées sont des cellules spécialisées capables de transformer un stimulus mécanique en signal électrique transmissible au système nerveux. Chez les mammifères, ces cellules sont incapables de se régénérer chez l'adulte, ce qui les rend fragiles et précieuses (Groves, 2010). Leur perte est irréversible et s'accompagne de surdités de type neurosensorielles dont l'origine est fréquemment génétique. Actuellement, les études sur les surdités génétiques sont principalement réalisées chez les rongeurs. Cependant, l'éthique nous pousse à réduire autant que possible les expérimentations animales, d'autant plus que les résultats ne sont pas toujours transposables à l'Homme en raison des disparités génomiques et métaboliques inter-espèces. Le laboratoire du Dr. Brigitte Malgrange a donc fait le choix de se positionner pour le développement et l'utilisation d'un modèle d'étude humain des surdités génétiques grâce à la différenciation *in vitro* de cellules souches pluripotentes induites humaines en cellules ciliées.

Ce projet est centré sur l'étude de deux surdités génétiques résultant de la mutation des gènes *ALMS1* et *CDK5RAP2*. La mutation autosomale récessive du gène *ALMS1* provoque le syndrome d'Alström, caractérisé, entre autres, par une surdité neurosensorielle bilatérale progressive. La mutation autosomale récessive du gène *CDK5RAP2* est connue pour entraîner une forme de microcéphalie héréditaire primaire (MCPH) et a plus récemment été associée à des cas de surdité neurosensorielle. Ces deux protéines sont exprimées au niveau du centrosome/corps basal de la cellule, une structure discrète aux fonctions complexes.

L'objectif principal de ce travail a été de réussir à maîtriser la différenciation *in vitro* des hiPSCs en cellules ciliées afin d'obtenir un modèle d'étude humain robuste et fiable. Nous avons ensuite utilisé ce modèle pour tenter de découvrir et de comprendre comment les mutations d'*ALMS1* et de *CDK5RAP2* affectent la fonction auditive.

Matériel et méthodes



Culture des fibroblastes humains

Les fibroblastes sont maintenus dans un milieu de culture composé de DMEM (Lonza – 12-604F) additionné de 10% de sérum fœtal bovin (FBS, ThermoFisher Scientific), de 1% d'acides aminés non-essentiels (Gibco – 11140-035) et de 1% de pénicilline/streptomycine en solution (Gibco – 15140-122). Ils sont cultivés en flasques T25 durant leur maintien et en plaques 24 puits sur lamelles de verre stériles en vue d'un immunomarquage ultérieur. Afin d'assurer la bonne adhérence des cellules, les flasques et lamelles sont préalablement traitées à la gélatine 0,1% pendant 20 minutes à température ambiante. Lorsque les cellules atteignent une confluence d'environ 90%, elles sont détachées à la trypsine-EDTA 0,05% (Gibco – 25300-054), comptabilisées à l'aide d'un compteur cellulaire automatique (Scepter, Merck Millipore) et remises en culture à hauteur de 100.000 cellules par flasque et de 5.000 à 15.000 cellules par lamelle selon l'expérience. Les fibroblastes peuvent également être congelés. Pour cela, les cellules sont reprises dans une solution composée de 90% DMSO et 10% FBS puis placées à -80°C dans un dispositif assurant le refroidissement doux et régulier à raison de 1 degré par minute. Une fois congelées, les cellules sont transférées dans une tourie à azote liquide.

Préparation de MEFs inactivés

Les MEFs commerciaux (Millipore ; PMEF-CFL) sont mis en culture en présence de milieu DMEM (Lonza – 12-604F) additionné de 10% de FBS, de 1% d'acides aminés non-essentiels (Gibco – 11140-035) et de 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco – 15140-122) dans des flasques préalablement traitées à la gélatine 0,1% pendant 20 minutes à température ambiante. Après 3 phases d'amplification correspondant à des passages à 1 dans 6, les cellules sont détachées chimiquement à la trypsine-EDTA 0,05% (Gibco – 25300-054) puis inactivées par irradiation à 30Gy avant d'être comptées et congelées dans un mélange de 90% DMSO et 10% FBS suivant un protocole similaire à celui observé pour les fibroblastes humains. Chaque gélule contient 1×10^6 MEF inactivés.

Reprogrammation des fibroblastes humains en hiPSCs

La reprogrammation des fibroblastes en hiPSCs est réalisée en laboratoire de biosécurité de type II. Pour cela, nous avons utilisé le kit CytoTune Sendai Vector (Thermofisher Scientific – A16517) et suivi le protocole qui y est recommandé. Ainsi, 100.000 cellules sontensemencées dans un puits contenant 3 ml de milieu additionné de 4ng/ml de FGF2 (Peprotech – 100-18B), puis sont traitées avec une MOI (pour « multiplicity of infection ») de 3. Le lendemain, le puits est rincé une fois avec du DMEM afin d'éliminer les particules virales. Le milieu est remplacé par du milieu frais contenant

4ng/ml de FGF2. Au jour 4 du protocole, les cellules sont détachées à la trypsine-EDTA 0,05% (Gibco – 25300-054) et remises en culture sur un tapis de MEFs irradiés. Un inhibiteur de Rock, le Y-27632 (Selleck Chemicals – S1049) est ajouté au milieu à hauteur de 10µM afin de limiter la mort cellulaire. A partir du 5^{ème} jour post-transduction, le milieu est remplacé quotidiennement par du KSR-FGF composé de DMEM/F12 + GlutaMax (Gibco – 31331-028), 20% de sérum de remplacement knock-out (Gibco – 10828-028), 1% d'acides aminés non-essentiels (Gibco – 11140-035) et 4ng/ml de FGF2 ajouté fraîchement au milieu. Notons que 0,5mM d'acide valproïque (VPA ; Sigma – P4543) et 10µM de Y-27632 sont ajoutés au milieu de culture entre les jours 5 et 15 du traitement. Les colonies d'hiPSCs sont visibles entre 2 et 3 semaines post-transduction et sont dès lors cultivées comme telles (voir Culture des hiPSCs). Leur validation est réalisée par RT-qPCR, immunomarquage et différenciation *in vitro* et *in vivo* en cellules issues des trois feuillets embryonnaires.

Culture des hiPSCs

Au cours de ce projet, nous avons utilisé 4 lignées de hiPSCs saines (hiPSCs WT-A, WT-B, WT-C et WT-D) ainsi que 2 lignées mutées (hiPSCs ALMS1 et hiPSCs CDK5RAP2). La lignée WT-A est issue de l'institut I-STEM (Evry, France) et les lignées hiPSCs WT-C et WT-D proviennent de l'institut Coriell (New Jersey, USA). Les colonies d'hiPSCs sont cultivées sur des boîtes de Pétri recouvertes d'une matrice extracellulaire synthétique (Geltrex ; Fisher Scientific – 12063569) diluée à 1% dans du DMEM-F12+ GlutaMax (Gibco – 31331-028). La polymérisation de cette matrice est réalisée à 37°C pendant minimum 2h et maximum 24h avant stockage des boîtes à 4°C. Le milieu de culture consiste en du milieu KSR-FGF conditionné. Ce milieu, composé de DMEM/F12 + GlutaMax (Gibco – 31331-028), 20% de sérum de remplacement knock-out (Gibco – 10828-028), 1% d'acides aminés non-essentiels (Gibco – 11140-035), est placé durant 24h en présence de MEFs inactivés afin d'être enrichi. Il est filtré avant d'être utilisé, ou congelé pour utilisation ultérieure. Du FGF2 (Peprotech – 100-18B) est ajouté juste avant utilisation du milieu. Les lignées hiPSCs WT-A, WT-B, WT-D, ALMS1 et CDK5RAP2 nécessitent une concentration finale de 4ng/ml de FGF2 alors que la lignée WT-C nécessite une concentration finale équivalente à 100ng/ml pour maintenir un état prolifératif indifférencié. Lorsque la taille des colonies est suffisante, un passage mécanique est réalisé : les plus belles colonies sont sélectionnées et quadrillées à l'aide de l'extrémité d'un embout de pipette de 10µl. Les fragments sont récupérés et mis en culture dans du milieu KSR-FGF conditionné en présence de Y-27632.

Table 2 : Résumé des hiPSCs utilisées au cours de ce travail

Nom	Provenance	[FGF2]	Type de lignée	Genre et âge du donneur
hiPSCs WT-A	I-stem Institute (hiPSCs WT1582)	4ng/ml	Saine	♀ - /
hiPSCs WT-B	Reprogrammées au laboratoire à partir de fibroblastes HD3	4ng/ml	Saine	♂ -
hiPSCs WT-C	Coriell Institute (GM23446)	100ng/ml	Saine	♀ - 9 ans
hiPSCs WT-D	Coriell Institute (GM23394)	4ng/ml	Saine	♂ - 5 mois
hiPSCs ALMS1	Reprogrammées au laboratoire à partir de fibroblastes fournis par l'Université de Padoue, Italie	4ng/ml	Mutation du gène ALMS1 (c.[3425C>G] + [3425C>G])	♂ - 36 ans
hiPSCs CDK5- RAP2	Reprogrammées au laboratoire à partir de fibroblastes fournis par le centre hospitalier universitaire AP-HP de Paris, France.	4ng/ml	Mutation du gène CDK5- RAP2	♀ - /

Différenciation spontanée en 3 feuillets embryonnaires

La différenciation spontanée *in vitro* consiste à sevrer les hiPSCs en facteurs de croissance. Pour cela, les colonies sont détachées puis mises en culture dans des plaques 6 puits à faible adhérence dans du milieu KSR (sans FGF2) qui est remplacé tous les deux jours. Après 7 jours, les EBs (pour « Embryoid bodies ») formés sont replacés en culture adhérente pendant 14 jours sur des boîtes traitées

à la gélatine 0.1% pendant 20 minutes à température ambiante. A la fin du protocole, les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde 4% puis traitées pour immunomarquage.

Formation de tératomes

Cette expérience a été menée en accord avec la commission d'éthique de l'ULiège quant à l'utilisation des animaux (dossier n°11-1133). Les colonies d'hiPSCs sont dissociées à l'acutase (STEMCELLS Technologies – #07922) pendant 10 à 15 minutes à température ambiante, et 1×10^6 cellules sont reprises dans 100 μ L d'une solution faite de 50% de DMEM/F12 + GlutaMax (Gibco – 31331-028) et 50% de matrice synthétique de type Matrigel (BD Biosciences – 354277). La suspension cellulaire est alors injectée en sous-cutané dans la cuisse arrière de jeunes mâles âgés de 8 semaines. Les souris utilisées sont immunodéficientes (SCID-beige ; Laboratoires Charles River) et sont donc gardées dans un environnement libre de pathogènes pendant 8 semaines supplémentaires. Elles sont ensuite sacrifiées en accord avec le programme d'éthique par dislocation cervicale. Les tumeurs sont prélevées et fixées dans du paraformaldéhyde 4% durant une nuit. Elles sont ensuite déshydratées grâce à une solution de saccharose 30% avant d'être enchâssées en paraffine. Leur analyse histologique est réalisée sur des coupes de 12 μ m d'épaisseur obtenues au microtome et colorées avec une solution d'hématoxyline-éosine (en collaboration avec le service d'anatomo-pathologie du CHU de Liège du Pr. Delvenne). Les images ont été prises à l'aide d'un microscope Leica DMIL-LED.

Caryotype

Dans un premier temps, de la colcémide est ajoutée aux cultures d'hiPSCs jusqu'à atteindre une concentration finale de 0,1 μ g/ml dans le but de bloquer les cellules en métaphases du cycle cellulaire. Après 3h d'incubation à 37°C, les cellules sont détachées à la trypsine-EDTA 0,05% (Gibco – 25300-054) avant d'être placées dans une solution hypotonique de KCl 75nM durant 14 minutes à 37°C. Une fois les membranes cellulaires brisées, la suspension chromosomique est fixée par un mélange fraîchement préparé de méthanol et d'acide acétique glacial à 3 : 1 puis étalée sur une lame en chambre humide. Finalement, une coloration à l'éosine-bleu de méthylène selon Wright (Merck – 101383) permet d'analyser le caryotype des cellules sur la plateforme Leica CytoVision GLS120.

Différenciation 2D en progéniteurs otiques

Les colonies d'hiPSCs sont dissociées pendant 20 minutes à température ambiante avec de l'acutase (STEMCELLS Technologies – #07922). Entre 150000 et 300000 cellules sontensemencées

dans des plaques de culture 6 puits à faible adhérence contenant 2ml de milieu KSR (sans FGF2) additionné de 100ng/ml de DKK1 (Peprtech – 120-30), 10ng/ml d'IGF-1 (Peprtech – 100-11), 10µM de SB431542 (Sigma – S4317) et 10µM de Y-27632, ce qui favorise la formation d'EBs. La moitié du milieu est remplacé quotidiennement pendant 6 jours. Les EBs sont alors transférés dans des boîtes de Pétri préalablement coatées à la poly-L-ornithine 0.1mg/ml (Sigma – P4957) et à la laminine 10µg/ml (Sigma – L2020) afin d'accroître l'adhérence cellulaire au plastique. Les cellules sont alors cultivées dans du DMEM/F12 + GlutaMax (Gibco – 31331-028) enrichi d'1% de N2 (Gibco – 17502-048), 50ng/ml de sulfate d'héparane et 100ng/ml de FGF2 pendant 14 jours. Le milieu est totalement remplacé tous les deux jours. A la fin des 20 jours de différenciation en progéniteurs otiques (OSCs), les cellules sont détachées à la trypsine-EDTA 0,05% (Gibco – 25300-054) pour être transférées dans des boîtes de Pétri traitées à la gélatine 0.1% contenant du milieu DMEM/F12+GlutaMax complémenté avec 1% de N2, 2% de B27 sans vitamine A (Gibco – 12587-010), 20ng/ml de FGF2 (Peprtech – 100-18B), 20ng/ml d'EGF (Peprtech – AF-100-15) et 50ng/ml d'IGF-1 (Peprtech – 100-11). Les cellules sont maintenues en culture ou congelées dans une solution de DMSO 90%/FBS10% et conservées dans une tourie à azote liquide.

Différenciation 2D en cellules ciliées

Les OSCs sont mis en culture sur un tapis de cellules otiques issues de la dissection de cochlées ou d'utricules de souris à E14,5. Pour cela, les tissus récoltés sont immergés dans un mélange de papaine 20U/ml (Worthington – LS003118) et de DNase 0,05%. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, la réaction est arrêtée grâce à l'adjonction d'ovomucoïde (Sigma – T2011) et les tissus sont dissociés mécaniquement. Les cellules sont alors ensemencées à hauteur de 10.000 cellules/cm² dans des boîtes de Pétri traitées à la poly-L-ornithine 0,1mg/ml (Sigma – P4957) et laminine 10µg/ml (Sigma – L2020) contenant du milieu DMEM/F12+ GlutaMax (Gibco – 31331-028), 2% de supplément B27 sans vitamine A (Gibco – 12587-010), 10ng/ml de FGF2 (Peprtech – 100-18B) et 20ng/ml d'EGF. Après 4 à 6 jours de culture, les cellules nourricières forment un tapis sur lequel sont transférés les OSCs. Les cellules sont cultivées pendant 24h dans du milieu OSCs afin de favoriser la récupération cellulaire, puis elles sont sevrées en morphogène et maintenues dans du milieu DMEM/F12+ GlutaMax, 1% de N2 et 2% de B27.

Différenciation 3D en cellules ciliées

Le protocole suivi est celui de l'équipe du Dr. Hashino, publié en 2017 (Koehler et al., 2017). Brièvement, les hiPSCs sont traitées avec du Y-27632 au minimum 2h avant le début de l'expérience

afin de limiter la mort cellulaire. Les cellules sont ensuite détachées chimiquement avec de l'acutase (STEMCELLS Technologies – #07922) puis dispensées à hauteur de 5.000 cellules par puits dans une plaque 96 puits dont les parois sont spécifiquement traitées pour empêcher l'adhérence cellulaire (Fisher Scientific – 15227905) et contenant du milieu KSR-FGF conditionné avec Y-27632. Une rapide centrifugation de 2 minutes à 200g permet de regrouper les cellules et favorise la formation de corps embryonnaires. Après deux jours de récupération, la totalité du milieu est remplacé par du milieu CDM contenant 2% de Matrigel (Corning - 356238), 4ng/ml FGF2 (Peprotech – 100-18B), 10 μ M de SB-431542 (Sigma – S4317) et 2.5ng/ml de BMP-4 (Peprotech – 120-05) afin d'orienter la différenciation vers la formation d'ectoderme non-neural. Le milieu CDM se compose de 49% de Ham's F12 GlutaMax (Gibco – 31765-035), 49% de IMDM Glutamax (Gibco – 31980-030), 1% de lipides chimiquement définis (Gibco – 11905-031), 5mg/ml de BSA (Sigma – A1470), 7 μ g/ml d'insuline (Sigma – I9278), 15 μ g/ml de transferrine (Sigma – T8158), 450 μ M de 1-thioglycérol (Sigma – M6145). Après 4 jours, 25 μ l de CDM contenant 250ng/ml de FGF2 et 1 μ M de LDN-193189 (Stemgent – 04-0074) sont ajoutés à chaque puits dans le but d'induire la formation de progéniteurs du domaine épibranchiale et otique (OEPD). L'obtention de cellules de la placode otique est ensuite favorisée en ajoutant 25 μ l de CDM contenant 18 μ M de CHIR99021 (Stemgent – 04-0004) dans chacun des puits. Au jour 12, les agrégats sont rincés avant d'être inclus dans une goutte de Matrigel pur et déposés dans une boîte de Pétri. La matrice synthétique est laissée à 37°C pendant 30 minutes avant d'ajouter le milieu de maturation (OMM). Ce milieu est composé de 49% d'Advanced DMEM (Gibco – 12491-045), 49% de Neurobasal (Gibco – 21103-049), 0.5X supplément N2 (Gibco – 17502-048), 0.5X supplément B27 sans vitamine A (Gibco – 12587-010), 1X GlutaMax (Gibco – 35050-079) et 50mg/ml de Normocine (Invivogen – Ant-nr-1). Les cellules sont traitées 3 jours avec du CHIR99021, un inhibiteur de GSK3 et par conséquent activateur de la voie Wnt. Au jour 18 de la différenciation, les organoïdes sont rincés pour éliminer toute trace de CHIR99021 puis laissés en culture dans du milieu OMM sous agitation constante de 65 r.p.m. dans des plaques 24 puits sans adhérence (Nunclon Sphera ; Fisher Scientific – 15257905) ou dans le bioréacteur CERO (OMNI Life Science, Allemagne) pendant une période allant jusqu'à 4 mois. La moitié du milieu est remplacé tous les deux jours dans les plaques 24 puits et une fois par semaine dans les tube du bioréacteur.

Immunomarquages 2D

Les immunomarquages 2D sont réalisés sur des cultures cellulaires ou des coupes d'organoïdes obtenues au cryostat. Les cultures cellulaires sont fixées pendant 15 minutes avec du méthanol 100% froid à -20°C (pour le marquage du centrosome) ou avec de la paraformaldéhyde 4% à température ambiante selon l'anticorps utilisé. Les organoïdes sont fixés pendant 2 heures à température ambiante

dans de la paraformaldéhyde 4% avant d'être rincés 3x5 minutes dans du PBS puis disposés dans une solution cryoprotective de saccharose 15% durant une nuit minimum à 4°C. La solution est ensuite remplacée par du saccharose 30% pendant une nuit minimum à 4°C afin de poursuivre la cryopréservation de l'échantillon. Finalement, les organoïdes sont enchâssés dans du milieu de congélation de type O.C.T. (Richard-Alla Scientific Neg50 ; ThermoFisher Scientific – 6502-B), congelés et stockés à -80°C. Des coupes de 14 à 16µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un cryostat Microm HM560 (ThermoFisher Scientific) sont récupérées sur des lames résistantes au froid (SuperFrostPlus ; Fisher Scientific – 10356345) qui sont conservées à -80°C jusqu'à utilisation. Que ce soit sur coupe ou sur culture cellulaire, l'immunomarquage débute par une étape de blocage des sites aspécifiques pendant 1h à température ambiante avec une solution de PBS, 0,1% de Triton X100 et 10% de sérum d'âne (Jackson ImmunoResearch – 017-000-121). Si un démasquage est nécessaire, du tampon citrate chauffé à 95°C est ajouté sur les lames ou sur les cellules jusqu'à refroidissement complet (environ 10 minutes). Les échantillons sont rincés 3x 5 minutes au PBS avant d'ajouter les anticorps primaires. Ces derniers sont dilués aux concentrations voulues dans la solution de blocage et laissés au contact des échantillons durant une nuit à 4°C. Trois rinçages successifs avec 0,1% de TritonX100 dilué dans du PBS sont effectués avant d'ajouter les anticorps secondaires anti-IgG couplés à un fluorochrome 488, 555 ou 647 (1/1000, ALEXA) et du DAPI (1/5000) dans du PBS-0,1% de TritonX100. L'incubation dure une heure et s'effectue à température ambiante. Les échantillons sont à nouveau rincés 3x 5 minutes avec du PBS puis très rapidement à l'eau désionisée afin d'éviter la précipitation de sels. Ils sont finalement montés dans du milieu de montage (DAKO fluorescence mounting medium ; DAKO, Amérique du Nord - S3023). Les images ont été acquises sur un microscope confocal Olympus View FV1000 et analysées à l'aide du logiciel Fiji. La liste des anticorps primaires et secondaires utilisés est reprise dans la Table 3. Les expériences ont été réalisées au minimum deux fois.

Table 3 : Liste des anticorps utilisés au cours de ce travail.

Anticorps anti-:	Hôte	Dilution	Référence
ALMS1	Lapin	1/200	Abcam - ab84892
ATOH1	Lapin	1/100	Abcam - ab75354
BRACHYURY	Lapin	1/100	Abcam - ab20680
BrdU	Rat	1/250	AbDSerotec – OBT0030
CDK5RAP2	Souris	1/200	Sigma - AMAB91163
CNAP-1	Lapin	1/250	ProteinTech - 14498-1-AP
HUMAN NUCLEI	Souris	1/500	Merck - MAB1281
KI67	Souris	1/200	BD Pharmingen - 550609

MYOSINE6	Chèvre	1/100	Santa Cruz - sc-23568
MYOSINE7A	Lapin	1/250	Proteus Biosciences - 25-6790
NANOG	Chèvre	1/500	R&D Systems - AF1997
OCT4.	Lapin	1/500	Cell Signaling - 2890
PAX2	Lapin	1/500	Invitrogen - 10190043
PAX6	Chèvre	1/100	Santa Cruz - sc-7750
PHALLOIDINE-TRITC	/	1/1000	Sigma - P1951
pHH3	Lapin	1/500	Merck - 06-570
POU4F3	Lapin	1/250	Sigma - HPA03215
ROOTLETINE	Chèvre	1/500	Santa Cruz - sc-67824
SIX1	Souris	1/50.	Sigma - SAB1402356
SOX17	Chèvre	1/100	R&D Systems - AF1924
SOX2	Chèvre	1/200	Santa Cruz - 17320
TRA-1-81	Souris	1/200	Merck - MAB4381-20
βIII-TUBULINE	Souris	1/1000	BioLegend - 501202
γ-TUBULINE	Souris	1/200	Abcam - ab11316
γ-TUBULINE	Chèvre	1/250	Santa Cruz - sc7396

Incorporation de BrdU

Pour réaliser ce test, du BrdU est ajouté au milieu de culture des hiPSCs à une concentration finale de 10µM. Après 3h d'incubation, les cultures sont rincées 3x5 minutes avec du PBS avant d'être fixées 15 minutes avec du paraformaldéhyde 4% à température ambiante. Un immunomarquage dirigé contre le BrdU (anticorps AbD Serotec OBT0030, 1 :250) est alors effectué. Afin que le BrdU soit accessible aux anticorps, l'ADN est hydrolysé grâce à une solution de HCl 2M. Après 30 minutes, la réaction est arrêtée avec du tampon borax pendant 30 minutes à température ambiante. L'immunomarquage est finalement réalisé comme décrit plus haut.

Immunomarquage 3D

Les organoïdes sont fixés à température ambiante pendant 2h dans de la paraformaldéhyde 4% avant d'être rincés 3x10 minutes avec du PBS. Ils sont perméabilisés toute la nuit à température ambiante (PBS, 2% de Triton X-100). Les échantillons sont ensuite incubés une nuit supplémentaire à 4°C dans une solution de blocage (PBS, 10% de sérum et 0.2% de sodium azide). Ils sont alors mis en présence des anticorps primaires durant les deux jours suivants à 4°C (PAX2 à 1 :500 dans du PBS,

1% de sérum, 0.2% de triton X-100 et 0.2% de sodium azide). Les organoïdes sont rincés 2x1h puis toute une nuit (PBS, 3% de NaCl et 0.2% de Triton X-100) avant d'être incubés deux jours consécutifs dans la solution d'anticorps secondaires (Alexa Fluor 488 et DAPI à 1 :500 dans du PBS avec 0.2% de Triton X-100). Ils sont finalement à nouveau rincés 2x1h puis toute une nuit dans la solution de rinçage avant d'être clarifiés. La clarification s'effectue sur la nuit dans du RapiClear1.49 (SunJin Lab – RC149001, Nikon) à 4°C. L'acquisition des images est réalisée sur le microscope à feuille de lumière LightSheet Zeiss Z1 et l'analyse 3D grâce au logiciel Imaris 9.0.1.

Mesure de la distance entre centrioles

La mesure de la distance entre centriole est réalisée sur des cultures cellulaires fixées au méthanol 100% froid pendant 15 minutes à -20°C. Un immunomarquage dirigé contre γ -TUBULINE et pHH3 est réalisé et les images sont acquises au microscope confocal Olympus FV1000 avec l'objectif 60x à immersion et un zoom numérique 3x est appliqué. La distance intercentriolaire est mesurée en reliant la partie la plus externe de chacune des centrioles dans les cellules pHH3 grâce au logiciel Fiji. Les analyses statistiques ont été menées dans le logiciel Graph Pad Prism 7.00 et consistent en une ANOVA suivie d'un test de Kruskal-Wallis (* : p-value $\leq 0,05$; ** : p-value $\leq 0,01$; *** : p-value $\leq 0,001$; **** : p-value $\leq 0,0001$). Le n considéré est équivalent à une cellule et l'analyse a été effectuée sur minimum deux cultures distinctes par condition.

RT-qPCR

Dans un premier temps, les ARNs totaux ont été extraits des cultures en suivant les instructions des fournisseurs. Pour les hiPSCs, les fibroblastes et les OSCs, nous avons utilisé les kits RNeasy mini (Qiagen – 74104) ou NucleoZOL (Macherey-Nagel – 740404.200 et 740406.50). L'extraction d'ARN à partir d'organoïdes a été effectuée sur des groupes de 6 à 12 organoïdes en utilisant le kit NucleoSpin RNA XS (Macherey-Nagel – 740902.50). Les ADNc ont ensuite été générés à partir de 100ng (organoïdes) ou 1 μ g (hiPSCs, fibroblastes et OSCs) d'ARN grâce au kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisher Scientific – K1622). La PCR quantitative est réalisée dans des plaques 384 puits contenant 4 μ l d'ADNc dilués, 5 μ l de SYBR Green (Roche – 04 707 516 001) et 1 μ l d'un mélange d'amorces sens et anti-sens à 3 μ M. Elle est effectuée par sur une machine de type LightCycler 480 (Roche) et analysée grâce au programme LightCycler 480 IDEAS 2.0 (Roche). Les échantillons sont déposés en duplicatas et chaque expérience a été menée sur minimum 3 cultures distinctes. Les résultats ont été normalisés par rapport à l'expression des gènes de ménage GAPDH ou PPIA. La liste des paires d'amorces utilisées est reprise dans la Table 4.

Table 4 : Liste des amorces utilisées au cours de ce travail.

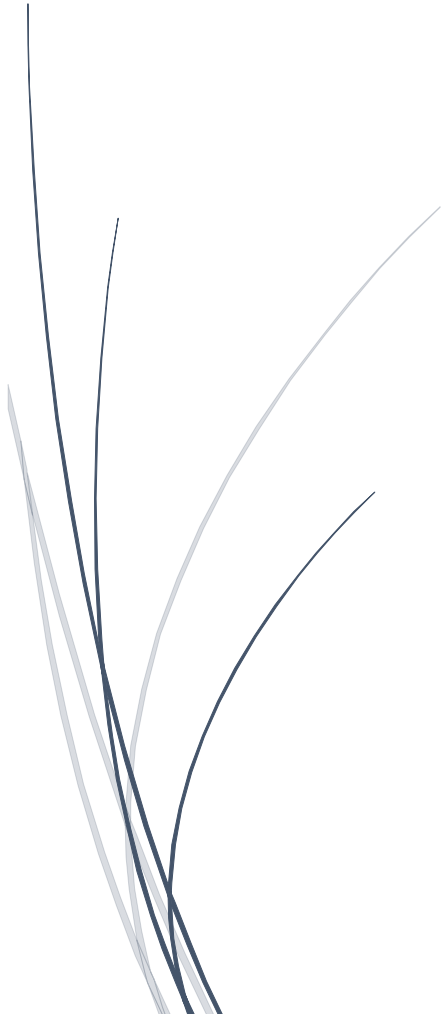
	Amorces sens	Amorces anti-sens
hEYA1	ACT GTC CCC AAT TGC TGA ACC TGA	ACC CCT GAT CAC AGG TGC AAA CAT C
hGAPDH	GCA TCT TCT TTT GCG TCG C	CCA AAT GCG TTG ACT CCG A
hNANOG	CTC CAA CAT CCT GAA CCT CAG	CGT CAC ACC ATT GCT ATT CTT CG
hOCT4	AGT TTG TGC CAG GGT TTT TG	ACT TCA CCT TCC CTC CAA CC
hPAX2	GAC TAT GTT CGC CTG GGA GAT TC	AAG GCT GCT GAA CTT TGG TCC G
hPAX8	TCA ATG CCT TTC CCC ATG CT	TTC ACT TCC TGC CAC CAT GC
hPPIA	CCA ACA CAA ATG GTT CCC AGT	CCA TGG CCT CCA CAA TAT TCA
hSIX1	TTC CTT CCC AAT GCA GAG ATC AGG G	AGG CTG CTG AAA CAG GCG TAT CAG
hTFAP2A	TAA AGC TGC CAA CGT TAC CC	GCA CAC GTA CCC AAA GTC C

Western blot

Les protéines sont extraites à partir des cultures de fibroblastes humains grâce à une solution RIPA composée de 50mM de Tris, 1% de NP40, 150mM de NaCl, 0,5% de sodium deoxydate, 0,1% de SDS et d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (cOmplete Mini ; Merck – 11836170001). La quantité totale de protéine est estimée par test colorimétrique au réactif de Bradford (Bio-Rad, 5000006) en comparaison d'une gamme de concentration établie à partir de plusieurs dilutions de BSA (Biolabs – B9001S). 70µg de protéines sont ensuite mélangés à 10µl de tampon de charge et à de l'eau déionisée jusqu'à atteindre un volume final de 40µl. Les échantillons sont chauffés à 95°C pendant 10 minutes afin de dénaturer les protéines. Les 70µg de protéines sont déposés sur un gel 4-12% Bis-Tris (Bolt ; ThermoFisher – NW04120BOX). La migration est effectuée pendant 1h30 à 200V dans le tampon de migration adéquat (Bolt MES SDS Running Buffer ; Invitrogen – B0002). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane PVDF activée au méthanol grâce à un courant électrique de 300mA appliqué pendant 2h dans du tampon fait de 25nM de Tris, 190mM de glycine et 20% de méthanol. Une étape de blocage d'une heure dans 40mM de Tris, 150mM de NaCl, 0,1% de Tween 20 (ci-après appelée TBST) complétée de 5% de lait en poudre permet de saturer les sites aspécifiques présents sur les protéines. La membrane est ensuite incubée toute une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire anti- γ TUBULINE (Cell signaling – 5886) dilué à 1 :1000 dans du TBST contenant 5% de BSA. Le lendemain, la membrane est rincée 3x5 minutes avec du TBST avant d'être mise à incuber 1heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à la HRP (1 :2000 ; ThermoFisher Scientific – G-21234). La membrane est à nouveau rincée 3x5 minutes dans du TBST avant d'être mise en contact avec le substrat de la HRP (Pierce ECL Western Blotting Substrate ; ThermoFisher Scientific – 32106) pendant une minute avant l'acquisition du signal par une caméra de

type CDD (ImageQuant™ LAS 4000, GE Healthcare Life Sciences). Les niveaux d'actines sont finalement mesurés sur cette même membrane. A cette fin, les anticorps précédents encore accrochés à la membrane sont arrachés par un bain de 2x 5 minutes dans un tampon fait de 1,5% de glycine, 0,1% de SDS, 1% de Tween 20 et dont le pH est ajusté à 2,2. Après 4x5 minutes de rinçage au TBST, une nouvelle étape de blocage des sites aspécifiques est réalisée avant d'incuber la membrane avec l'anticorps actine-HRP (1 :25.000 ; Sigma – A3854) toute une nuit à 4°C puis de procéder à la révélation du signal comme décrit ci-dessus.

Résultats



1. Etude du centrosome des fibroblastes humains sains et mutés

Dans le cadre de notre étude, nous avons reçu différentes lignées de fibroblastes humains provenant de donneurs sains ainsi que de patients porteurs de mutations sur le gène *ALMS1* ou *CDK5RAP2* (Figure 16). Le patient ALMS1 est porteur d'une mutation homozygote récessive située dans l'exon 8 (c.[3425C>G]) qui entraîne un décalage du cadre de lecture et l'apparition précoce d'un CODON STOP (p.S1142X) (patient n°2 (Zulato et al., 2011)). Le patient CDK5RAP2 est, quant à lui, porteur d'une mutation « composite » affectant les exons 4 et 36 (c.[217-220del.] + c.[5485dup.]) aboutissant toutes deux à l'apparition d'un codon STOP précoce (p.N75X pour la délétion et p.E1834X pour la duplication).

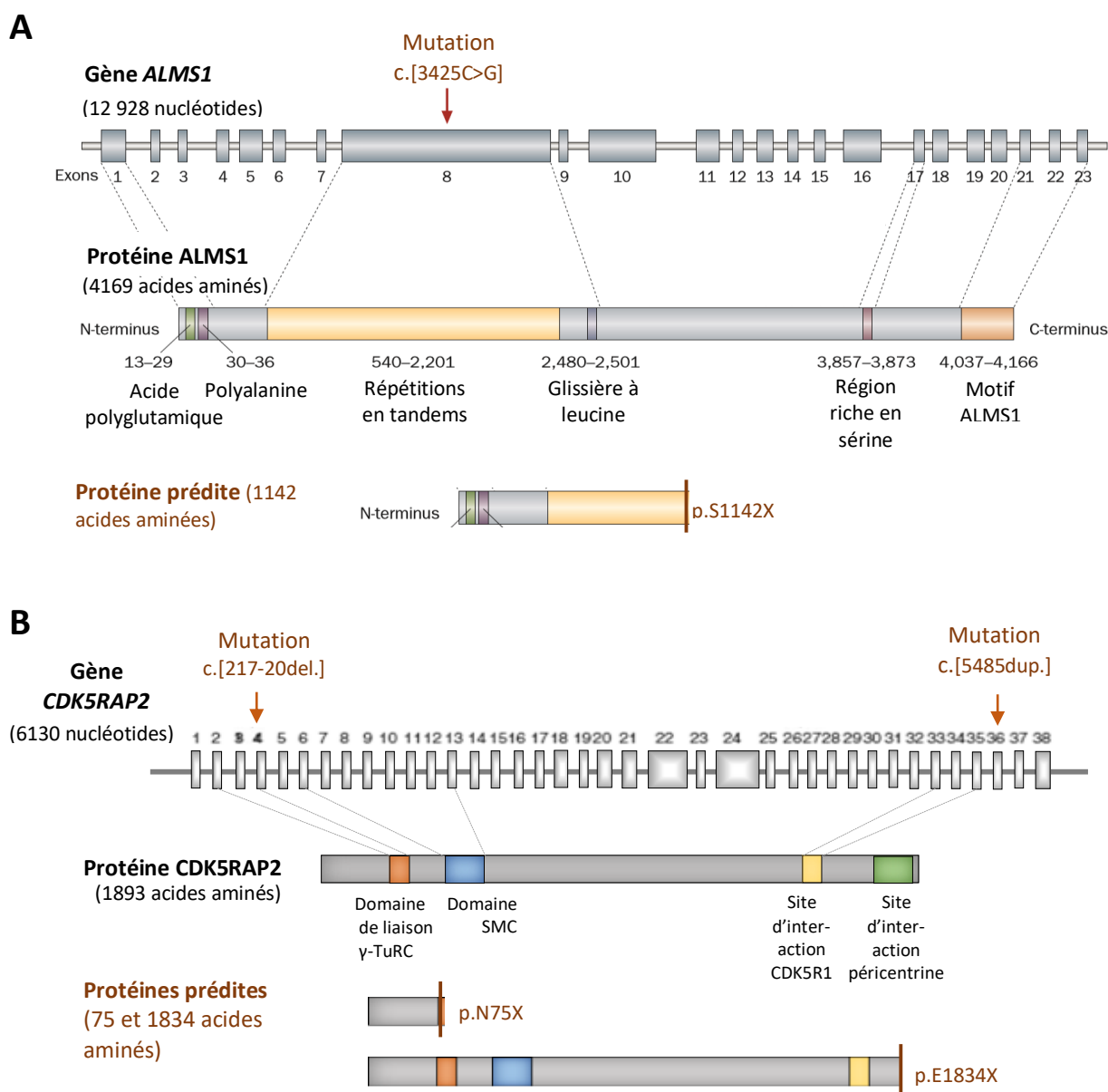
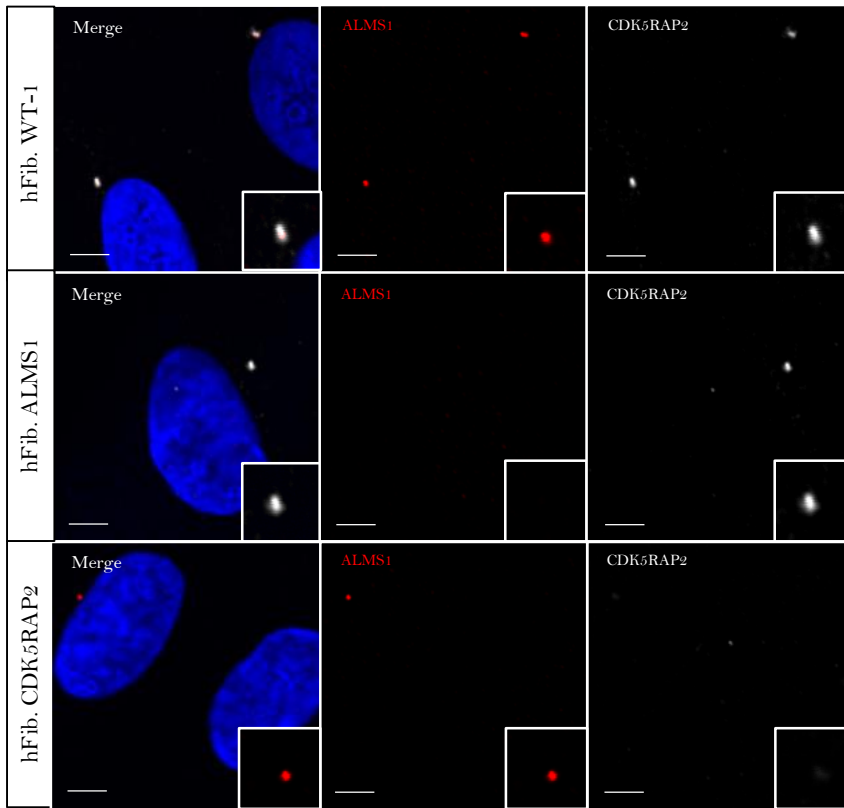


Figure 16 (page précédente) : Schématisation des gènes et protéines d'intérêts *ALMS1* et *CDK5RAP2*. A) Le gène *ALMS1* comporte 23 exons codant pour une protéine de 4169 acides aminés pour un poids moléculaire de 461kDa. Les fibroblastes *ALMS1* proviennent d'un patient sourd porteur d'une mutation homozygote située dans l'exon 8. Elle provoque l'apparition d'un codon *STOP* précoce et l'arrêt de la traduction en position 1142. B) Le gène *CDK5RAP2* est composé de 38 exons. Sa traduction donne naissance à une protéine de 1893 acides aminés. Les fibroblastes *CDK5RAP2* sont issus d'un patient sourd porteur d'une mutation composite. L'un des allèles présente une délétion dans l'exon 4 alors que l'autre est porteur d'une duplication dans l'exon 36. Dans les deux cas, il en résulte l'apparition de codons *STOP* précoces. Les protéines prédites sont écourtées à 75 et 1834 acides aminés, respectivement.

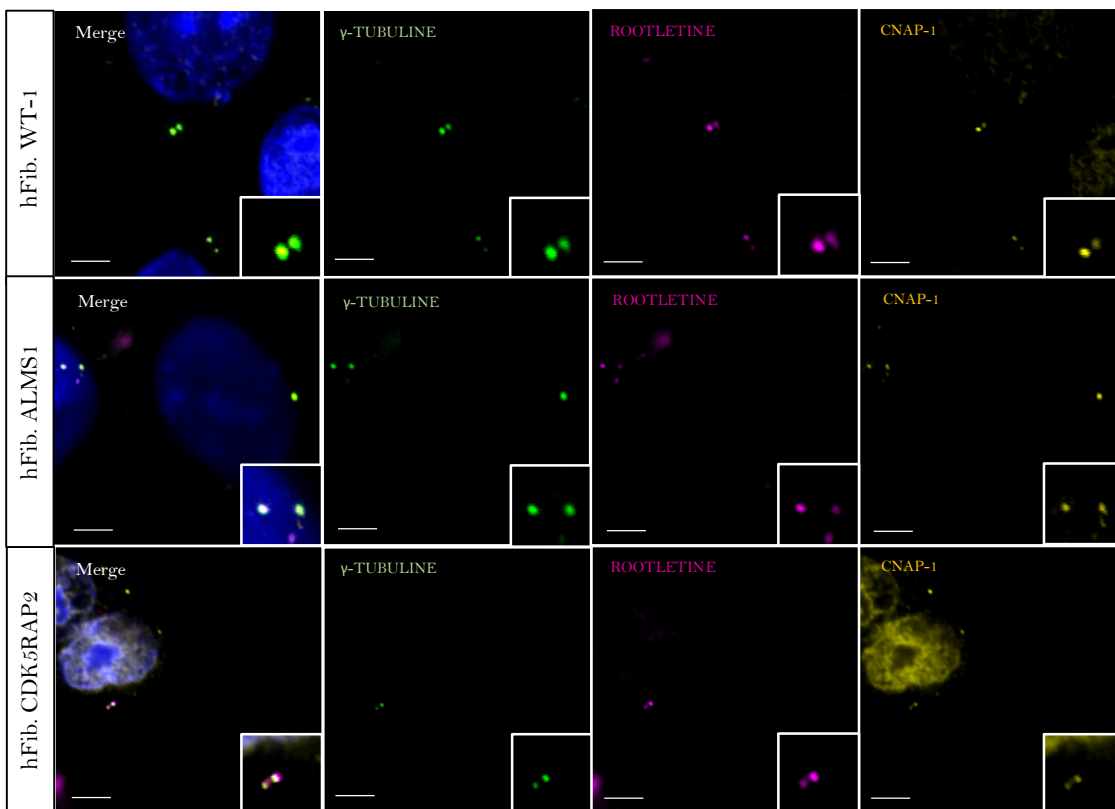
Dans un premier temps, nous avons réalisé sur les fibroblastes des immunomarquages spécifiques afin de vérifier l'expression centrosomale des protéines *ALMS1* et *CDK5RAP2* (Graser et al., 2007b; Hearn et al., 2005). Dans les fibroblastes provenant de donneurs sains (hFib.WT), nous observons une co-localisation des protéines *ALMS1* et *CDK5RAP2* exprimées spécifiquement dans le centrosome (Figure 17 A). En revanche, nos protéines d'intérêt ne sont pas détectables par immunomarquage dans les fibroblastes mutés pour *ALMS1* (hFib. *ALMS1*) ou *CDK5RAP2* (hFib. *CDK5RAP2*).

Afin de mesurer l'impact de la mutation d'*ALMS1* et de *CDK5RAP2* sur le centrosome, nous avons réalisé des immunomarquages dirigés contre d'autres protéines spécifiques de cette structure : γ -TUBULINE, ROOTLETINE et CNAP-1 (Figure 17 B). Les résultats suggèrent qu'en l'absence d'*ALMS1*, la distance entre les deux centrioles est anormalement grande (Figure 17 B). Afin de confirmer cette observation et de s'assurer qu'elle n'est pas liée à la séparation des centrioles lors de la mitose, nous avons réalisé des co-marquages avec la forme phosphorylée de l'histone H3 (pHH3) qui permet d'identifier les cellules en phase M du cycle. Ainsi, seules les cellules négatives pour pHH3 ont été considérées lors de nos mesures des distances intercentriolaires. Les résultats indiquent un écartement moyen de 1 μ m pour les différentes lignées de hFib. WT, alors qu'il est de 1,4 μ m dans les hFib.*ALMS1* (Figure 17 C). Cette augmentation d'environ 40% de l'espace intercentriolaire est hautement significative du point de vue statistique (p-value \leq 0,0001 ; ANOVA). Si cette modification de la structure du centrosome ne semble pas impacter l'expression des protéines γ -TUBULINE et ROOTLETINE, le marquage correspondant à la protéine CNAP-1 semble moins intense, suggérant une expression réduite ou une mauvaise localisation de la protéine.

A



B



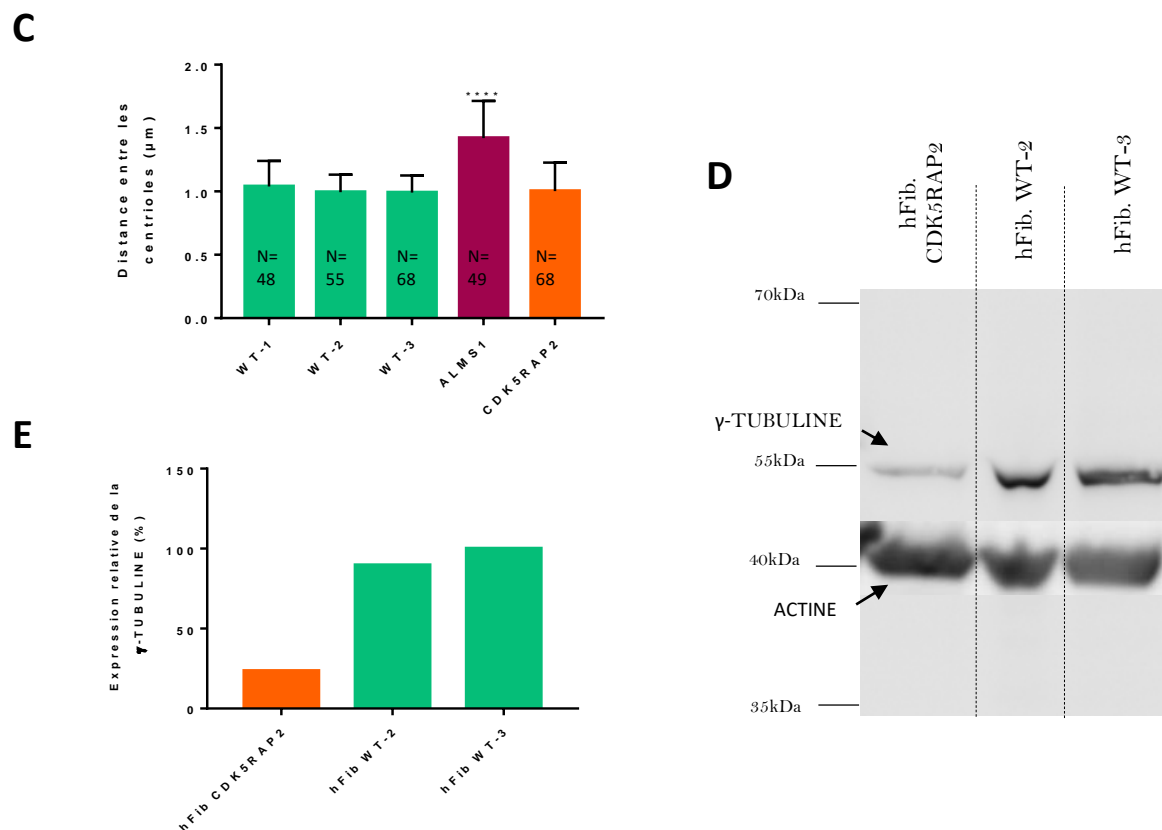


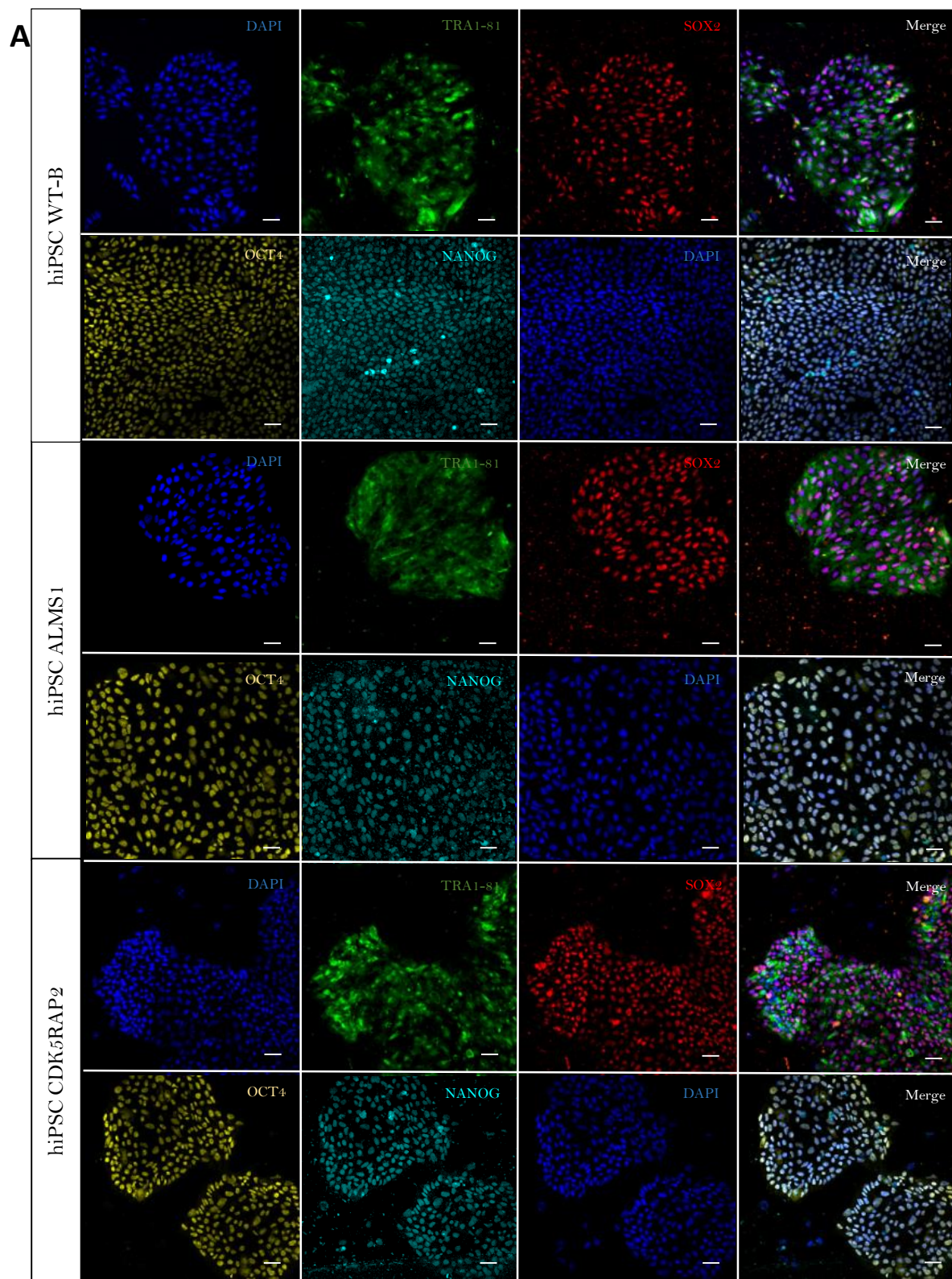
Figure 17 : Etude du centrosome des fibroblastes sains (hFib. WT-1, WT-2 et WT-3) et mutés pour ALMS1 (hFib. ALMS1) et CDK5RAP2 (hFib. CDK5RAP2). Immunomarquages dirigés contre les protéines γ -TUBULINE, ALMS1 et CDK5RAP2 (A) ainsi que contre les protéines ROOTLETINE et CNAP-1 (B). Dans les hFib.WT, l'expression centrosomale d'ALMS1 et de CDK5RAP2 est confirmée, alors que la mutation des gènes ALMS1 et CDK5RAP2 entraîne la perte de la protéine correspondante. La mutation d'ALMS1 semble également induire un accroissement significatif de la distance intercentriolaire, ce qui a été confirmé après mesure dans des cellules pHH3 négatives se trouvant hors de la phase M du cycle cellulaire (C) ($n = 48-68$; **** : p -value $\leq 0,0001$). La mutation de CDK5RAP2 n'impacte pas la distance intercentriolaire mais modifie l'expression centrosomale des protéines CNAP-1 et γ -TUBULINE. La quantification par Western blot (D et E) montre une diminution nette des niveaux de γ -TUBULINE dans les hFib. CDK5RAP2 comparativement aux hFib. WT (Expression relative de la γ -TUBULINE : hFib. WT-3 = 100% ; hFib. WT-2 = 89,7% ; hFib. CDK5RAP2 = 23,5%). Echelle (A et B) : 5 μ m.

La mutation de CDK5RAP2, quant à elle, n'impacte pas la distance intercentriolaire (Figure 17 B et C) mais semble perturber l'expression de certaines protéines du centrosome. En effet, le marquage γ -TUBULINE est systématiquement moins intense dans les hFib. CDK5RAP2 que dans les autres lignées étudiées (Figure 17 A et B).

Afin de déterminer si cela résulte d'une redistribution de γ -TUBULINE dans le cytoplasme ou d'une diminution réelle de son expression, nous avons réalisé un Western blot. Les résultats indiquent une diminution nette des taux de γ -TUBULINE dans les fibroblastes mutés pour CDK5RAP2 par rapport aux cellules WT (Figure 17 D et E). Ces résultats suggèrent que la perte de CDK5RAP2 s'accompagne d'une réduction du recrutement de γ -TUBULINE au niveau du centrosome et entraîne sa déstabilisation et sa dégradation. Il est en outre très intéressant de noter que le marquage centriolaire de CNAP-1 est lui aussi réduit dans les hFib. CDK5RAP2 (Figure 17 B), suggérant un rôle de CDK5RAP2 dans le recrutement et/ou le maintien de cette protéine au niveau du centrosome.

2. Reprogrammation des fibroblastes provenant de patients atteints de surdité génétique et validation des hiPSCs

Les lignées hiPSCs WT-B, hiPSCs ALMS1 et hiPSCs CDK5RAP2 ont été établies au laboratoire. Pour ce faire, les fibroblastes humains hFib. WT-1, hFib. ALMS1 et hFib. CDK5RAP2 ont été transduits avec un vecteur viral non-intégratif de type Sendai afin de permettre l'expression des facteurs de transcription OSKM (Fusaki et al., 2009). Au cours des 24 à 48 heures qui suivent, une forte mortalité est observée dans les cultures. Ensuite, une partie des cellules survivantes se multiplient pour former des colonies, chaque colonie étant issue de la prolifération d'une seule cellule. A ce stade, nous avons effectué un passage clonal en amplifiant plusieurs colonies séparément afin de générer plusieurs lignées d'hiPSCs. Nous avons ensuite évalué leurs capacités d'autorenouvellement et de pluripotence en réalisant des RT-qPCR et des immunomarquages spécifiques des cellules souches. Nous avons ainsi démontré que les lignées saines et mutées reprogrammées au laboratoire expriment des niveaux d'ARNm pour *NANOG* et *OCT4* plusieurs centaines de fois supérieurs à ceux observés dans les fibroblastes à partir desquels elles ont été générées (Figure 18 B). Nous avons également confirmé la présence des formes protéiques de NANOG et OCT4, ainsi que de SOX2 et TRA1-81, grâce à des immunomarquages (Figure 18 A).



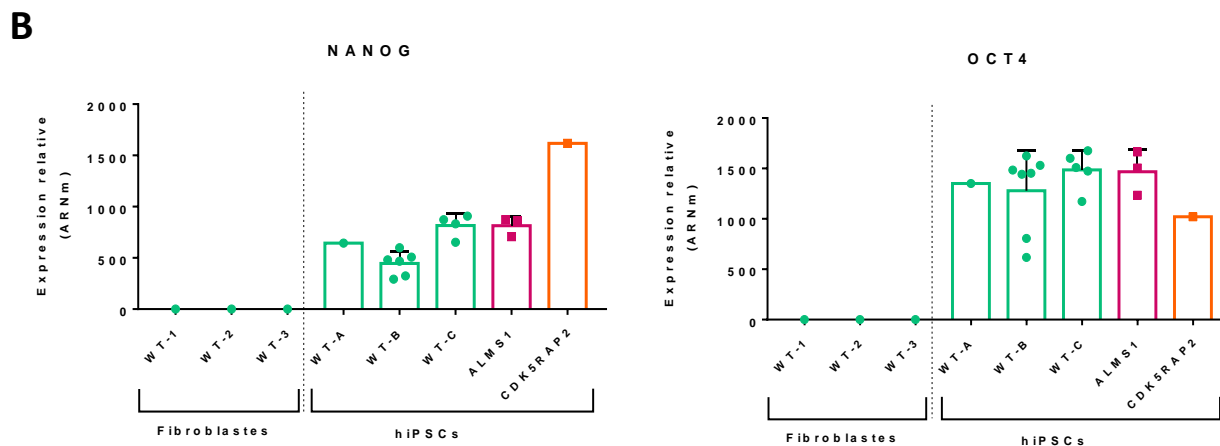


Figure 18 : Validation de l'expression des marqueurs de pluripotence et d'autorenouveaulement dans les hiPSCs saines (hiPSCs WT) et mutées pour ALMS1 (hiPSCs ALMS1) et CDK5RAP2 (hiPSCs CDK5RAP2). A) Immunomarquages dirigés contre TRA1-81, SOX2, OCT4 et NANOG. Les lignées hiPSCs saines et mutées expriment toutes ces différents marqueurs. Echelle : 50µm. B) RT-qPCR sur les hiPSCs. Les niveaux d'ARNm pour NANOG et OCT4 (normalisés par rapport à la GAPDH) sont plusieurs centaines de fois supérieurs dans les hiPSCs WT, ALMS1 et CDK5RAP2 que ceux observés dans les fibroblastes humains à partir desquels elles ont été générées.

Les cellules souches pluripotentes possèdent l'extraordinaire capacité de se différencier en n'importe quel type cellulaire issu des 3 feuillets embryonnaires (Evans and Kaufman, 1981). Nous avons évalué cette compétence dans nos lignées hiPSCs de deux façons distinctes : par différenciation spontanée *in vitro* et par formation de tératome *in vivo*. Dans le premier cas, les hiPSCs sont cultivées en l'absence de morphogènes afin d'induire leur différenciation spontanée en cellules originaires des trois feuillets embryonnaires. Après 20 jours, une analyse par immunomarquage révèle la présence de cellules neurectodermiques (positives pour PAX6, TUBULINE β -III), de cellules d'origine mésodermique (positives pour BRACHYURY, ACTINE- α) et de cellules endodermiques (positives pour SOX17, α -FOETOPROTEINE 1) (Figure 19 A). La confirmation *in vivo* de la pluripotence des hiPSCs requiert leur injection dans des souris immunodéficientes. Après 8 semaines, des coupes histologiques des masses tumorales sont colorées à l'aide d'une solution d'hématoxyline-éosine avant d'être analysées. La présence de structures ectodermiques, mésodermiques et endodermiques atteste de la formation d'un tératome et donc de la pluripotence des cellules hiPSCs WT-B et hiPSCs ALMS1 injectées (Figure 19 B). Notons que cette analyse n'a pu être réalisée pour les hiPSCs CDK5RAP2 pour des raisons techniques. En effet, nous avons noté une sensibilité des hiPSCs CDK5RAP2 aux changements de milieu ainsi qu'aux étapes de congélation et décongélation des gélules stocks. Cette sensibilité rend difficile la culture de cette lignée en condition indifférenciée ainsi que son amplification.

Dès lors, priorité a été donnée aux expériences de validation nécessitant une plus petite quantité de matériel.

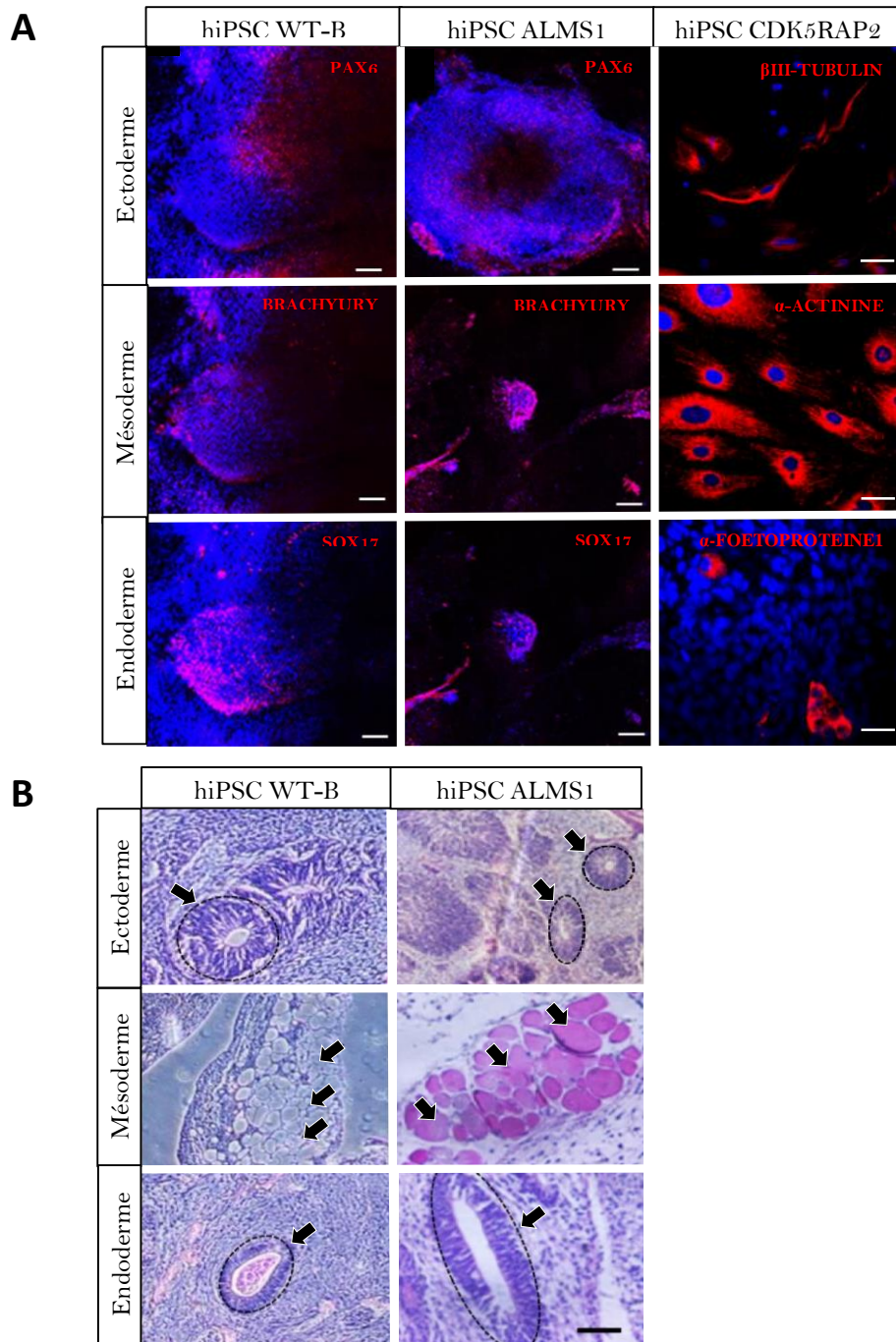


Figure 19 (page précédente): Différenciation in vitro et in vivo des hiPSCs saines et mutées en cellules issues des 3 feuillets embryonnaires. A) Immunomarquages démontrant la capacité des hiPSCs WT-B, hiPSCs ALMS1 et hiPSCs CDK5RAP2 à se différencier spontanément en cellules d'origine neurectodermique (PAX6, TUBULINE β -III), mésodermique (BRACHYURY, ACTINE- α) et endodermique (SOX17, α -FOETOPROTEINE 1) après 20 jours de culture in vitro sans morphogènes. B) Analyse histologique des masses tumorales 8 semaines après injection des hiPSCs dans des souris immunodéficientes. La présence de structures ectodermiques, mésodermiques et endodermiques confirme la pluripotence des cellules hiPSCs WT-B et hiPSCs ALMS1.

Finalement, puisqu'il a été mis en évidence que les hiPSCs pouvaient présenter une instabilité chromosomique suite à la reprogrammation (Mayshar et al., 2010), nous avons réalisé le caryotype des hiPSCs. Aucune anomalie chromosomique majeure n'a été identifiée dans nos lignées saines et mutées pour ALMS1 ou CDK5RAP2 (Figure 20).

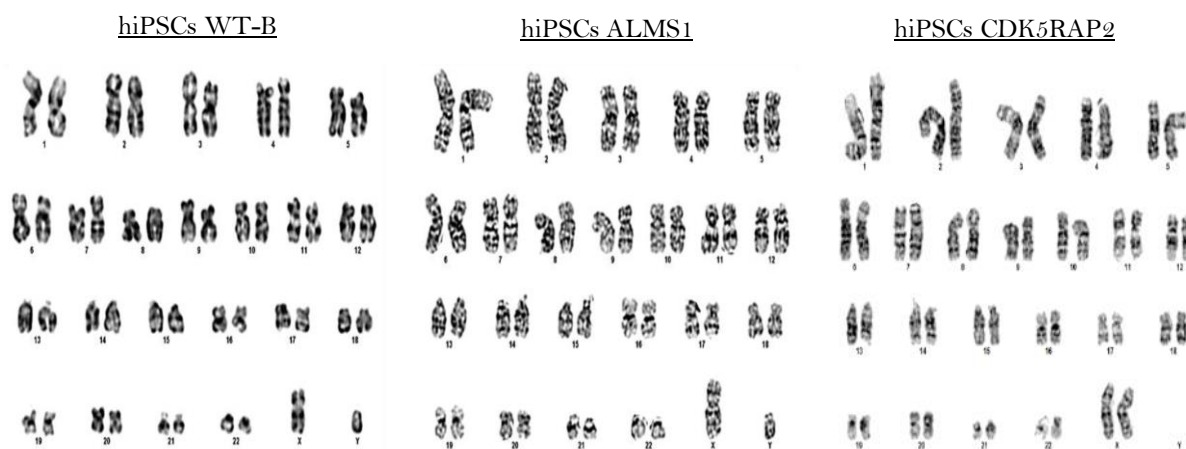


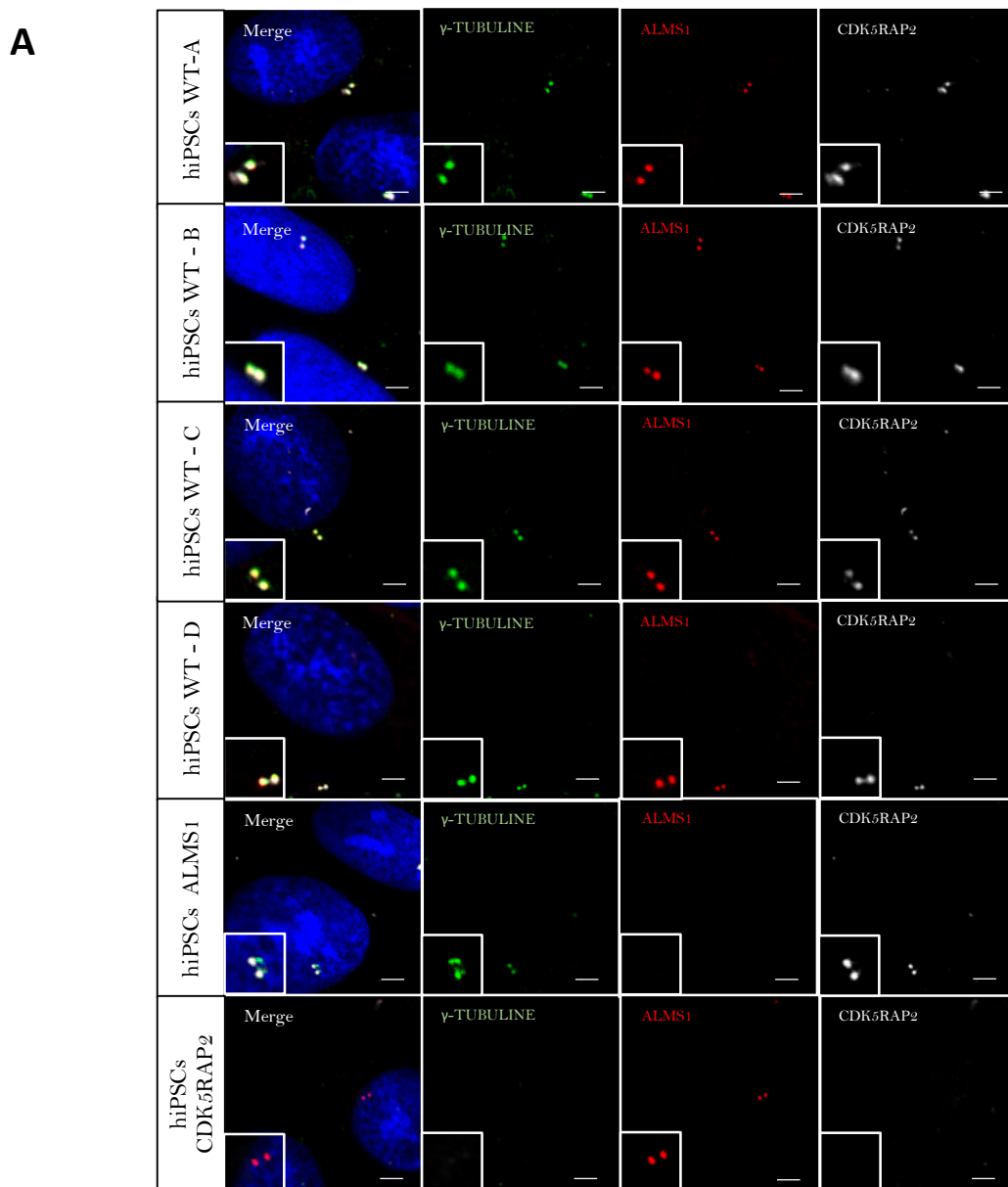
Figure 20 : Caryotype des hiPSCs WT-B, hiPSCs ALMS1 et hiPSCs CDK5RAP2. Aucune anomalie majeure n'a été détectée suite à la reprogrammation des fibroblastes humains en hiPSCs.

L'ensemble de ces résultats (Figures 18, 19 et 20) indique que les cellules reprogrammées à partir des fibroblastes humains sont bien des cellules souches pluripotentes induites, et que les mutations pour ALMS1 et CDK5RAP2 n'ont pas interféré avec le processus de reprogrammation.

3. Impact des mutations d'ALMS1 et CDK5RAP2 dans les hiPSCs

Nous avons ensuite analysé nos hiPSCs mutées afin de déterminer si elles développaient les mêmes phénotypes que ceux constatés dans les fibroblastes mutés. Pour cela, nous avons à nouveau réalisé des immunomarquages dirigés contre ALMS1, CDK5RAP2 et γ -TUBULINE (Figure 21 A) ainsi que contre ROOTLETINE et CNAP-1 (Figure 21 C). Comme attendu, les protéines ALMS1 et

CDK5Rap2 sont localisées au niveau du centrosome dans les 4 lignées hiPSCs saines étudiées alors qu'elles sont indétectables dans les lignées mutées correspondantes (Figure 21 A). Notons que l'absence d'ALMS1 n'altère pas l'expression centrosomale de CDK5RAP2, et inversement. Nous retrouvons un accroissement significatif de la distance intercentriolaire (Figure 21 B) ainsi qu'une intensité plus faible du marquage CNAP-1 (Figure 21 C) dans la lignée mutée pour ALMS1 comparativement aux lignées saines. De plus, le signal correspondant à la γ -TUBULINE est beaucoup plus faible voire absent dans les hiPSCs CDK5RAP2 (Figure 21 A).



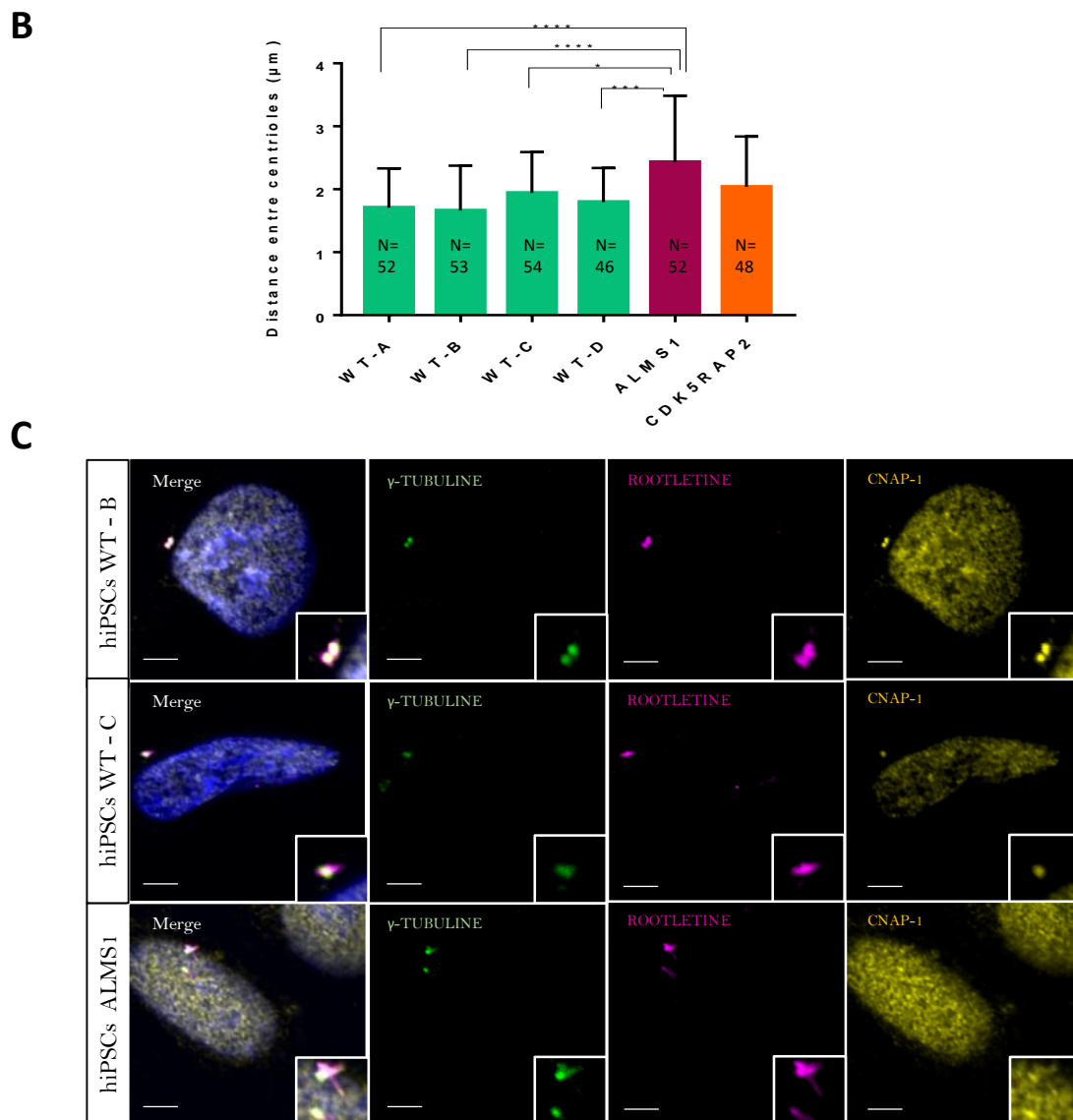
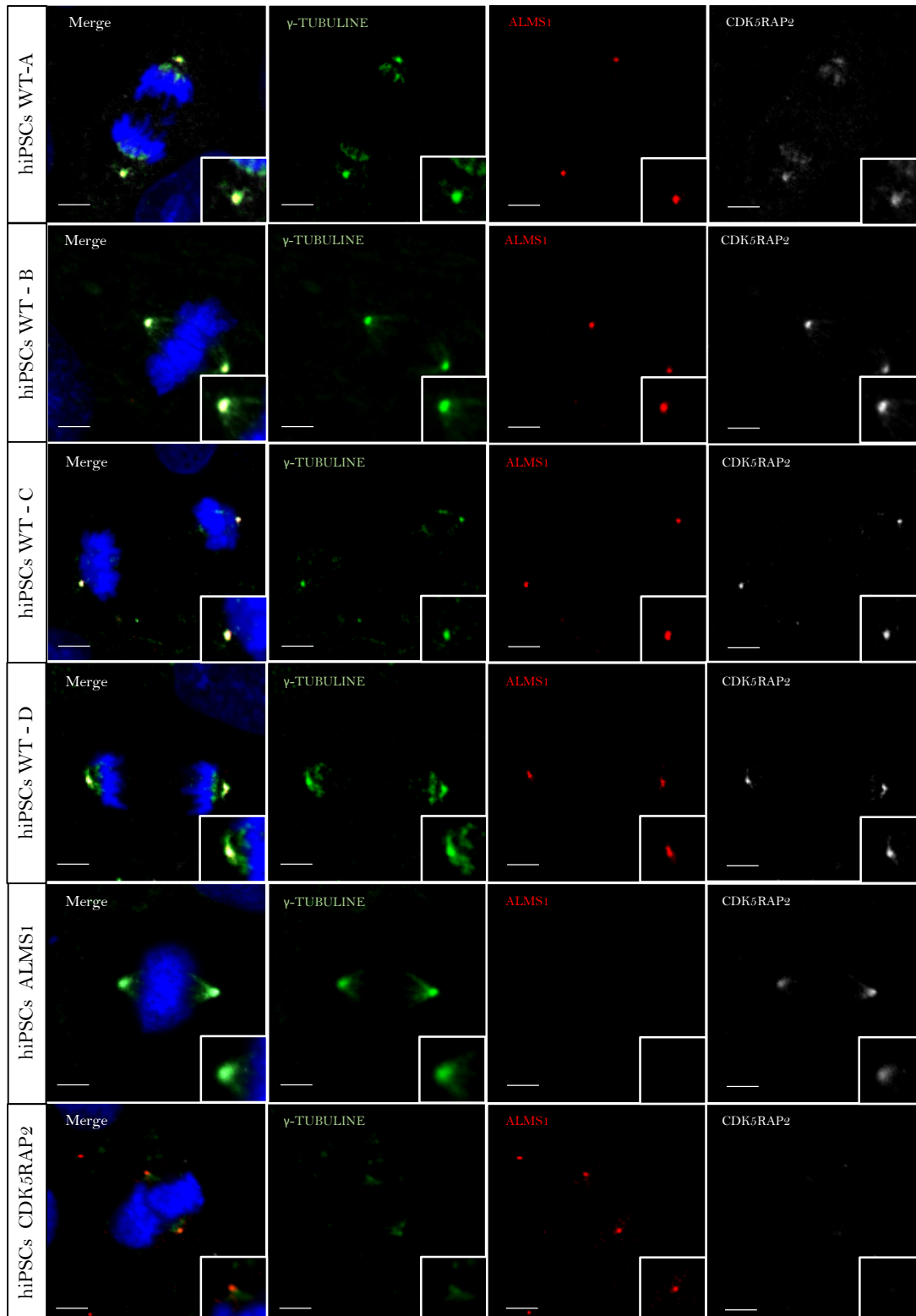


Figure 21 : Etude par immunomarquages de l'expression de protéines centrosomales dans les hiPSCs saines (hiPSCs WT-A, B, C et D) et mutées pour ALMS1 (hiPSCs ALMS1) et CDK5RAP2 (hiPSCs CDK5RAP2). A) Les protéines ALMS1 et CDK5RAP2 se localisent au niveau du centrosome dans les hiPSCs saines. Aucun signal correspondant à ALMS1 et CDK5RAP2 n'est détecté dans les lignées mutées correspondantes, à savoir hiPSCs ALMS1 et hiPSCs CDK5RAP2 respectivement. L'absence d'ALMS1 ne semble pas altérer l'expression de CDK5RAP2, et inversement. Le marquage de γ -TUBULINE est très faible voire indétectable dans les hiPSCs CDK5RAP2. Echelle = 5 μ m. B) La mesure de la distance intercentriolaire dans des cellules pHH3 négatives (n=46-54) montre un accroissement significatif de la distance intercentriolaire dans les hiPSCs ALMS1 comparativement aux hiPSCs WT (* : p-value $\leq 0,05$; *** : p-value $\leq 0,001$; **** : p-value $\leq 0,0001$). C), Les hiPSCs ALMS1 présentent un marquage nettement moins intense et parfois même indétectable de CNAP-1 par rapport aux cellules WT. Echelle= 5 μ m.

Le centrosome étant une structure impliquée dans la division cellulaire, nous nous sommes intéressés à la capacité de nos hiPSCs à se diviser correctement. Un premier indice nous a été fourni par le maintien en culture des hiPSCs. En effet, nos colonies d'hiPSCs saines aussi bien que mutées s'élargissaient à vue d'œil jour après jour et nécessitaient un passage régulier, témoignant de la prolifération des cellules en culture. De plus, nous avons pu observer grâce au DAPI des cellules en mitose caractérisées par la condensation des chromosomes (Figure 22 A). Un immunomarquage dirigé contre γ -TUBULINE nous a renseigné sur la formation des pôles mitotiques, visibles dans les hiPSCs WTs et hiPSCs ALMS1 en mitose mais à peine distinguables dans les hiPSCs CDK5RAP2 (Figure 22 A). Nous avons dès lors traité les hiPSCs durant 6 heures avec de la BrdU, réalisé des immunomarquages anti-BrdU et anti-KI67 (un marqueur de cellules en phase active du cycle cellulaire) et compté le nombre de cellules positives afin d'évaluer la prolifération (Figure 22 B et C).

De façon intéressante, les hiPSCs CDK5RAP2 semblent contenir une plus faible proportion de cellules en phase active du cycle cellulaire (positives pour KI67) que les lignées WTs et ALMS1. Il est intéressant de noter que la quantité de cellules ayant incorporé du BrdU est réduite de façon similaire. Ces résultats suggèrent que les hiPSCs prolifèrent moins lorsqu'elles sont mutées pour *CDK5RAP2*. Il serait intéressant de pousser plus loin la caractérisation du phénotype lié au cycle cellulaire dans ces cellules. Cependant, les symptômes développés par les patients porteurs de mutations du gène *CDK5RAP2* n'étant vraisemblablement pas liés à un problème de prolifération des cellules souches pluripotentes au cours de l'embryogenèse, nous ne nous sommes pas attardés sur l'étude du phénotype dans les hiPSCs afin de nous concentrer sur l'obtention et l'analyse des cellules otiques *in vitro*.

A



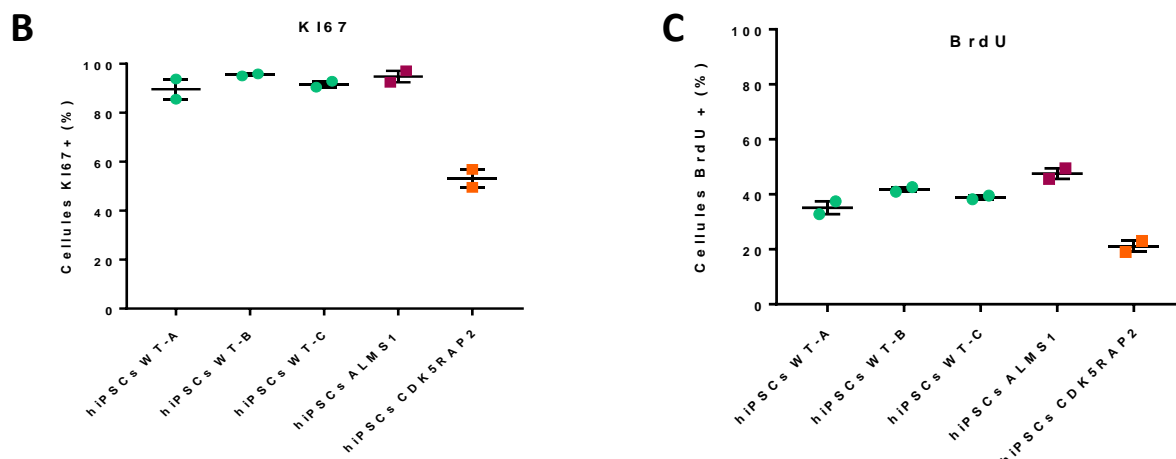


Figure 22 : Evaluation de l'impact des mutations d'ALMS1 et de CDK5RAP2 sur la capacité des hiPSCs à se diviser. A) Immunomarquages dirigés contre ALMS1, CDK5RAP2 et γ -TUBULINE sur des cellules en mitose. L'absence d'ALMS1 ne semble pas altérer la formation des pôles mitotiques alors que la mutation de CDK5RAP2 entraine une réduction nette de la γ -TUBULINE au niveau des centrosomes. Echelle = 5 μ m. B et C) Comptage du pourcentage de cellules positives pour KI67 (B) et du pourcentage de cellules ayant intégré du BrdU (C). Le marquage KI67 indique la proportion de cellules en phase active du cycle cellulaire. Les cellules positives pour le BrdU ont incorporé l'analogue de la thymidine lors de la réplication de leur ADN et représentent donc la proportion de cellules en phase S. Les pourcentages de cellules positives pour Ki67 ainsi que pour BrdU sont réduits de moitié dans les hiPSCs CDK5RAP2 comparativement aux hiPSCs WT et hiPSCs ALMS1.

4. Différenciation 2D des hiPSCs saines et mutées

Le modèle de différenciation 2D des hiPSCs en cellules otiques que nous avons utilisé a été établi au laboratoire par Benjamin Grobarczyk au cours de sa thèse (intitulée « Utilisation des cellules souches à pluripotence induite humaines normales et mutantes pour l'étude et le traitement des surdités génétiques »). Il s'inspire de plusieurs protocoles de différenciation publiés précédemment (Chen et al., 2012; Oshima et al., 2010b; Ronaghi et al., 2014) et a été mis au point sur les hiPSCs WT-B. Il consiste en deux phases distinctes : une première étape de différenciation en progéniteurs otiques, appelés ci-après OSC pour « Otic Stem Cells », suivie par une étape de différenciation en cellules ciliées. L'avantage présenté par ce protocole est qu'il est possible de passer les OSCs plusieurs fois avant de les différencier en cellules ciliées, ce qui permet leur amplification et la congélation de gélules stocks. Il n'est donc plus nécessaire de recommencer systématiquement l'étape d'induction otique dans les hiPSCs.

4.1. Obtention et étude des progéniteurs otiques

4.1.1. Induction de progéniteurs otiques (OSCs)

La première étape de l'induction en OSCs est réalisée en culture flottante, sous forme d'EBs. Elle consiste à guider les hiPSCs vers un destin ectodermique en bloquant les voies de signalisation TGF- β et WNT grâce à l'ajout d'inhibiteurs dans le milieu de culture (SB431542 et DKK1, respectivement) (Gadue et al., 2006). Nous suppléons également le milieu avec de l'IGF-1 afin de promouvoir l'émergence d'ectoderme antérieur, connu pour être plus réceptif à l'induction otique (Pera et al., 2001). Après 6 jours de ce traitement, les EBs sont placés dans des conditions de culture adhérente (Figure 23). L'activation massive de la voie FGF durant 14 jours grâce à une concentration élevée de FGF2 (100ng/ml) dans le milieu ainsi que l'adjonction d'héparane sulfate assure ensuite l'induction en OSCs (Freter et al., 2008).

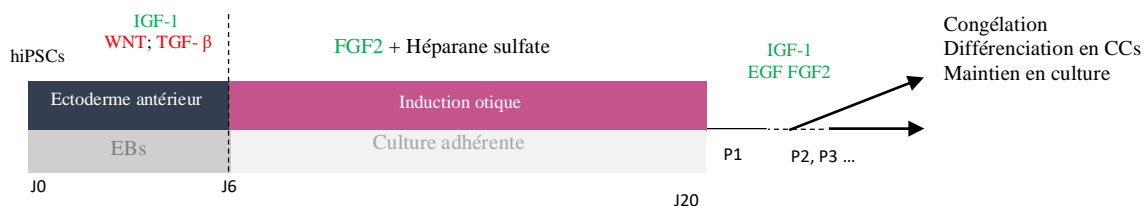


Figure 23 : Protocole d'induction otique. La première étape est réalisée en culture non-adhérente pour permettre la formation d'EBs. Les voies de signalisation favorisant la différenciation en mésoderme et endoderme (*WNT* et *TGF- β*) sont inhibées afin de permettre l'émergence d'ectoderme. L'ajout d'IGF-1 encourage la formation d'ectoderme antérieur, plus sensible à la différenciation otique. La seconde étape de différenciation est réalisée en culture adhérente et consiste à activer fortement la voie *FGF*, ce qui suffit à l'induction otique. Les OSCs ainsi obtenues peuvent être maintenues en culture sur plusieurs passages.

A la fin des 20 jours de différenciation, environ un tiers des cellules co-expriment les marqueurs de progéniteurs otiques PAX2 et PAX8 ainsi que PAX2 et SIX1 (Figure 24 A). Après le premier passage, de nombreuses cellules meurent, ce qui permet l'enrichissement des cultures en OSCs jusqu'à atteindre environ 80% de cellules positives pour PAX2 et PAX8 ainsi que pour PAX2 et SIX1 (Figure 24 B). Une fois ce modèle de différenciation établi sur les hiPSCs WT-B, nous avons réalisé des RT-qPCR sur nos différentes lignées saines et mutées dans le but d'évaluer les niveaux d'expression de plusieurs gènes exprimés au cours de la différenciation otique (TFAP2A, EYA1, SIX1 et PAX2) (Figure 24 C).

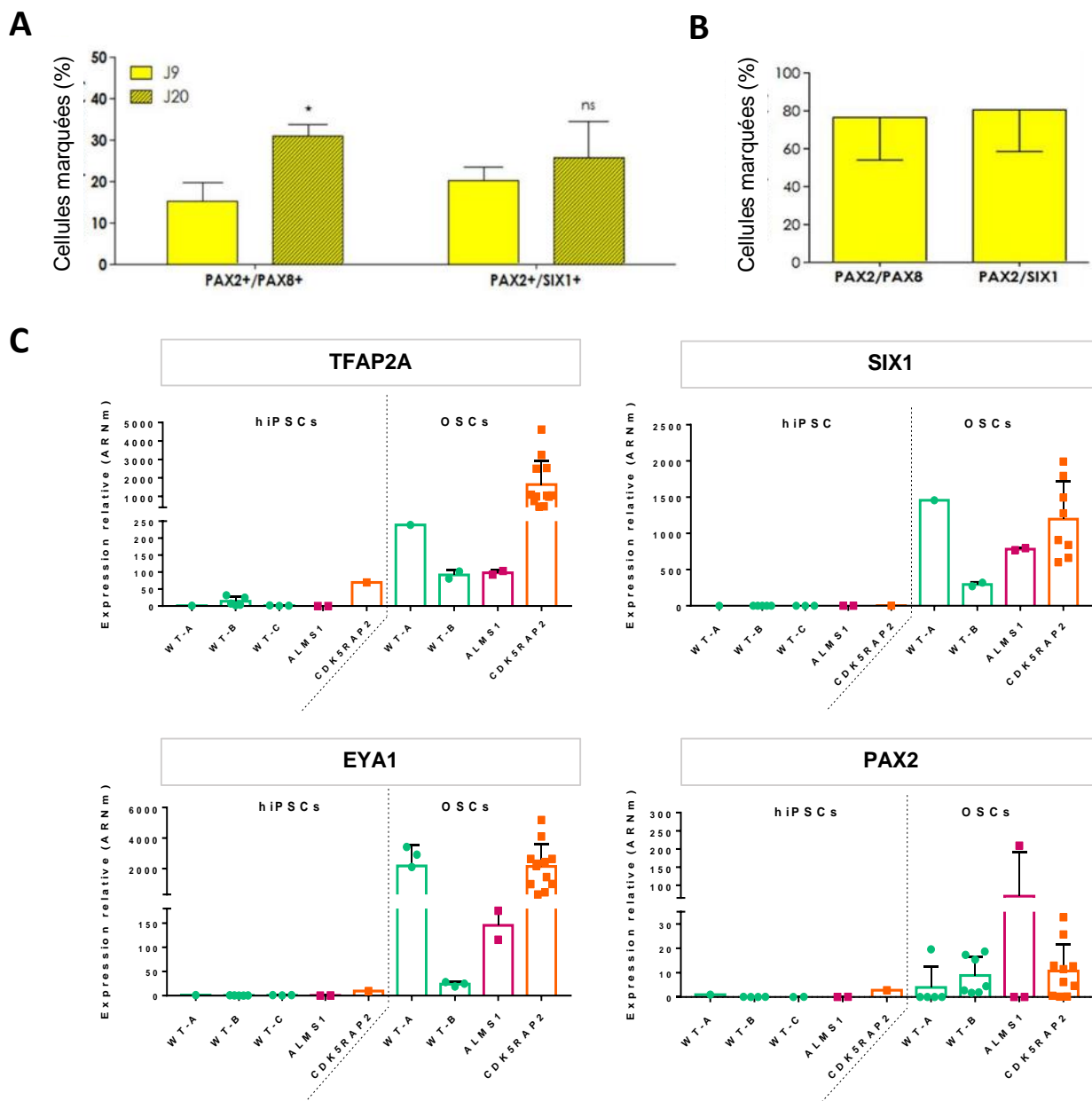


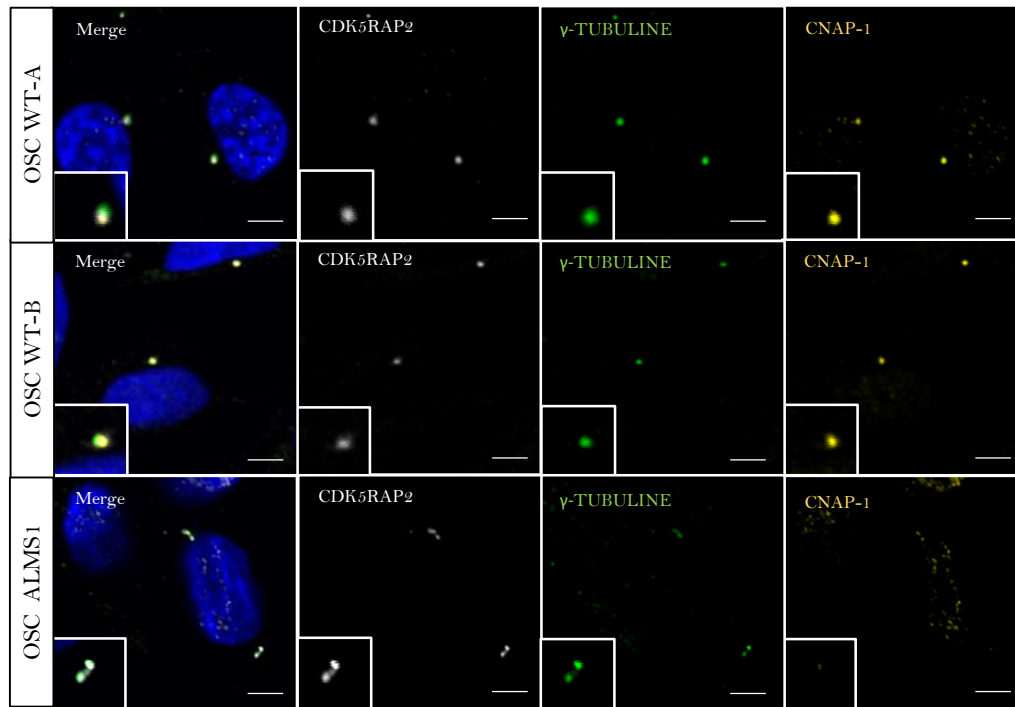
Figure 24 : Caractérisation des progéniteurs otiques (OSCs). Comptage des cellules doubles-positives pour PAX2/PAX8 et PAX2/SIX1 après immunomarquages à la fin du processus de différenciation des hiPSCs WT-B (A) et après passage des OSCs (B). Au 20^{ème} jour d'induction otique, environ 30% des cellules co-expriment les marqueurs susmentionnés. Après passage, il y a un enrichissement en OSCs dont la proportion atteint les 80%. C) Evaluation des niveaux d'ARNm de plusieurs marqueurs exprimés au cours de l'induction otique (TFAP2A, SIX1, EYA1 et PAX2) dans les lignées OSCs WT-A, WT-B, ALMS1 et CDK5RAP2. Le gène de référence utilisé pour la normalisation est GAPDH et les niveaux d'ARNm sont rapportés à ceux obtenus pour les hiPSCs WT-A. Bien qu'il existe une variabilité dépendante de la lignée et de l'expérience considérée, l'ensemble de nos lignées OSCs WT et mutées présente une forte expression des gènes étudiés. Ces résultats suggèrent que les mutations d'ALMS1 et de CDK5RAP2 n'empêchent pas la formation de progéniteurs otiques.

Il apparait clairement que notre protocole de différenciation induit l'expression de ces marqueurs aussi bien dans les lignées saines que mutées. Ces résultats suggèrent que les mutations des gènes *ALMS1* et *CDK5RAP2* n'empêchent pas la différenciation en OSCs. Notons que chaque lignée possède une capacité à se différencier qui lui est propre, et que cette variabilité est bien connue dans le domaine des cellules souches. Nous avons également constaté une variabilité dans les résultats obtenus au sein d'une même lignée selon l'expérience considérée, ce qui s'explique par une sensibilité inégale des lignées aux traitements mais également par une proportion du nombre d'OSCs fluctuante en fin de processus de différenciation.

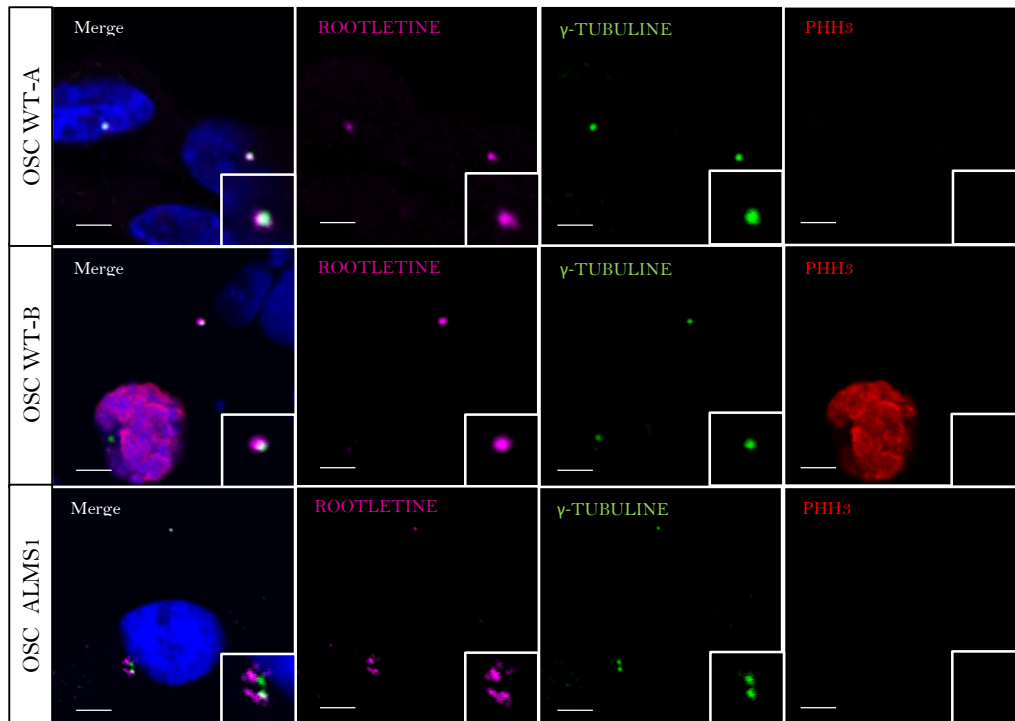
4.1.2. Impact des mutations d'*ALMS1* et de *CDK5RAP2* dans les OSCs

Commençons par souligner que les OSCs *CDK5RAP2* prolifèrent très lentement et ne supportent pas la congélation, ce qui a grandement limité les possibilités d'étudier l'impact de la mutation de *CDK5RAP2* dans les OSCs. Les résultats suivants ne concernent donc que les OSCs WT et les OSCs *ALMS1*. Nous nous sommes une fois de plus intéressés à la structure du centrosome et à l'expression des protéines centrosomales *CDK5RAP2*, γ -TUBULINE, CNAP-1 et ROOTLETINE. Nous avons pu observer par immunomarquages une diminution drastique de l'intensité du signal correspondant à la protéine CNAP-1 (Figure 25 A) dans les OSCs *ALMS1* comparativement aux OSCs WT. Les marquages *CDK5RAP2* (Figure 25 A), γ -TUBULINE ou ROOTLETINE sont quant à eux similaires à ceux obtenus dans les OSCs contrôles (Figure 25 B). Nous avons également constaté que la mutation d'*ALMS1* induit un accroissement de la distance intercentriolaire dans les OSCs mutés (Figure 25 B et C), de façon similaire à ce que nous avons noté dans les fibroblastes et les hiPSCs mutés. Cette observation a été confirmée après mesure systématique de la distance intercentriolaire dans les cellules pHH3 négatives (Figure 25 C).

A



B



C

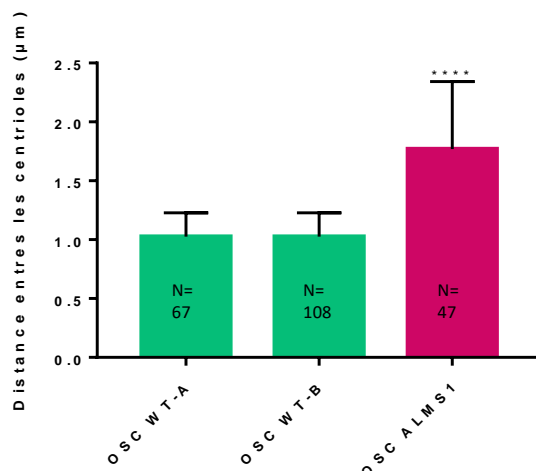


Figure 25 : Etude par immunomarquages de l'expression de protéines centrosomales dans les OSCs sains (OSC WT-A, B) et mutés pour ALMS1 (OSC ALMS1). A et B) La mutation d'ALMS1 ne semble pas altérer l'expression de CDK5RAP2, de γ -TUBULINE ou de ROOTLETINE alors que le signal correspondant à CNAP-1 est très faible voire indétectable. Echelle = 5 μ m. C) La mesure de la distance intercentriolaire dans des cellules pHH3 négatives (n=48-108) montre un accroissement significatif dans les OSCs ALMS1 comparativement aux OSCs WT (**** : p-value \leq 0,0001).

4.2. Différenciation des OSCs en cellules ciliées

La co-culture de progéniteurs otiques sur un tapis de cellules nourricières mésenchymateuses favorise leur différenciation en cellules ciliées (CCs) (Chen et al., 2012; Ding et al., 2016; Oshima et al., 2010b; Tang et al., 2016). Puisqu'au cours du développement embryonnaire murin les cellules ciliées commencent à se former aux alentours de E14-E15, il est probable que les facteurs favorisant leur émergence au départ des progéniteurs otiques soient sécrétés durant cette fenêtre temporelle. C'est pourquoi nous avons choisi de cultiver nos OSCs WT-B sur un tapis de cellules provenant de la dissociation de cochées murines à E14,5 plutôt que d'utricules de souris ou de poulet précédemment utilisés dans la littérature. Après 10 jours de co-culture, nous avons réalisé des immunomarquages dirigés contre ATOH1 et MYOSINE6, des marqueurs spécifiques des cellules ciliées, ainsi que contre une protéine spécifique des noyaux humains afin de nous assurer que les cellules ciliées observées dérivent bien de nos OSCs humains et pas d'une différenciation des cellules nourricières murines. A la fin du processus de différenciation, des rosettes de cellules humaines positives pour ATOH1 et MYOSINE6 sont observées dans les cultures (Figure 26).

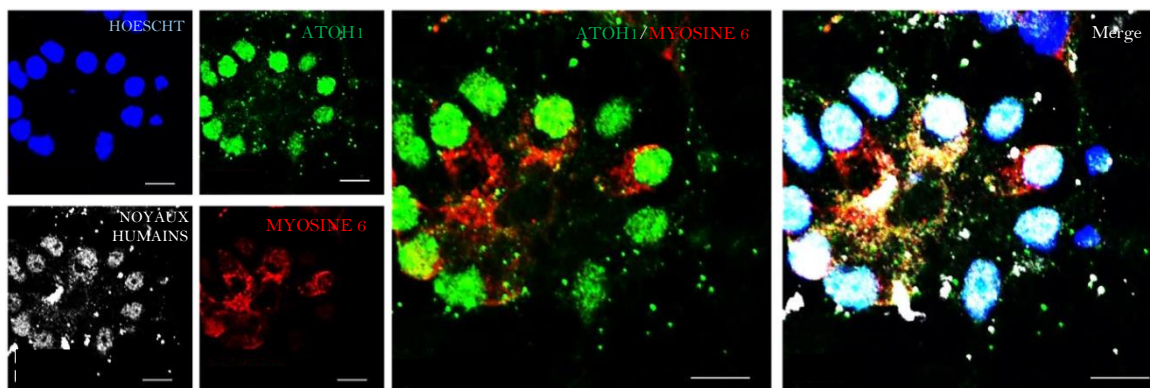


Figure 26 : Différenciation terminale des OSCs en cellules ciliées. Après 10 jours de culture sur cellules nourricières murines issues de la dissociation de cochlées à E14,5, des rosettes de cellules humaines positives pour les marqueurs de cellules ciliées ATOH1 et MYOSINE6 sont visibles après immunomarquages. Echelle = 50 μ m.

Bien que nous ayons réussi à obtenir des cellules ciliées, le rendement est malheureusement très faible. Nous avons essayé d'en augmenter l'efficacité en cultivant les OSCs sur d'autres types de cellules nourricières (cellules stromales d'utricule de souris ; cellules stromales d'utricule de poulet), avec ou sans traitement à l'EGF et à l'acide rétinoïque connus pour améliorer la différenciation. Ces diverses tentatives ne nous ont pas permis d'améliorer de façon significative l'obtention de cellules ciliées humaines en culture. Dans ces conditions, il n'a pas été possible de réaliser des analyses comparatives et d'étudier l'impact des mutations d'*ALMS1* et *CDK5RAP2* dans les progéniteurs otiques. Notons que l'efficacité mitigée de la différenciation 2D en cellules ciliées a déjà été rapportée dans la littérature (Chen and Streit, 2013; Ding et al., 2016; Ohnishi et al., 2015; Ronaghi et al., 2014).

5. Différenciation 3D des hiPSCs saines et mutées en cellules ciliées

Face au succès relatif des protocoles de différenciation en 2 dimensions, l'équipe du Dr. Hashino a élaboré un modèle *in vitro* récapitulant autant que possible les étapes du développement physiologique de l'oreille interne (Figure 27) (Koehler et al., 2017). Ainsi, la culture est menée en 3 dimensions sur une période beaucoup plus longue (entre 70 et 150 jours) et donc plus proche de celle nécessaire à l'émergence des cellules ciliées au cours de l'embryogenèse humaine. La modulation des voies de signalisation y est également au plus proche de ce qui est décrit au cours du développement physiologique.

Ce protocole de différenciation 3D – dite en organoïdes - peut être divisé en deux étapes : l'étape d'induction otique (J0 à J18) durant laquelle plusieurs voies de signalisation sont activement modulées ; et la phase de maturation (J19 à J150) durant laquelle les cellules s'auto-organisent au sein de l'organoïde et sécrètent elles-mêmes les facteurs nécessaires à la différenciation en cellules ciliées.

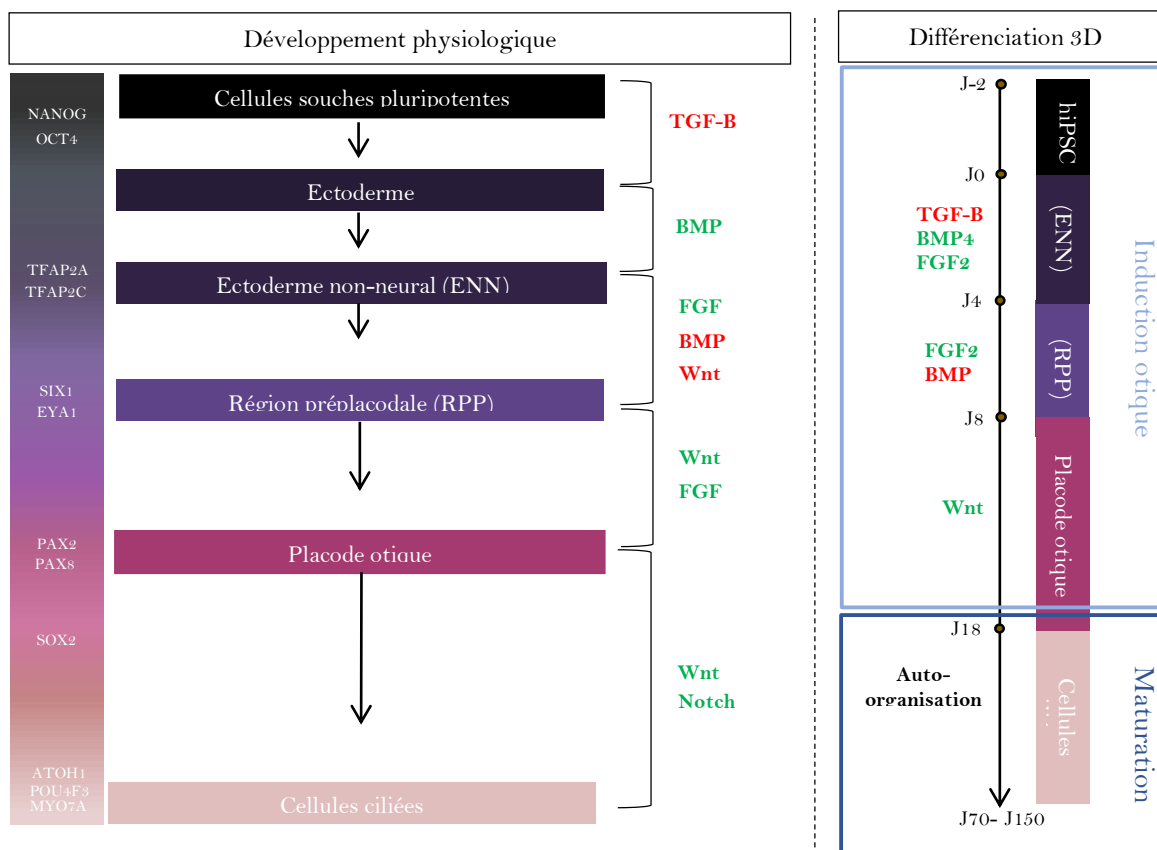


Figure 27 : Comparaison entre le développement embryonnaire aboutissant à la formation des cellules ciliées et le protocole 3D de différenciation in vitro.

5.1. Phase d'induction otique

Nous avons appliqué ce protocole de différenciation 3D à deux lignées hiPSCs saines (WT-A et WT-B) ainsi qu'aux lignées hiPSCs ALMS1 et CDK5RAP2. Dans un premier temps, nous avons vérifié l'évolution de plusieurs marqueurs otiques au cours de la phase d'induction grâce à des RT-qPCR (Figure 28). Les niveaux d'ARNm sont rapportés à ceux obtenus au jour 0, c'est-à-dire au stade hiPSCs. L'ensemble des lignées présentent des profils d'expression similaires, avec une chute de l'expression d'*OCT4* (marqueur de pluripotence) dès le début de l'induction otique. Cette perte de pluripotence est corrélée à une augmentation progressive de l'expression de *TFAP2A* (marqueur d'ectoderme non-neural), *EYA1* (marqueur de la région pré-placodale), *PAX2* et *PAX8* (marqueurs de la placode otique) au cours de la différenciation.

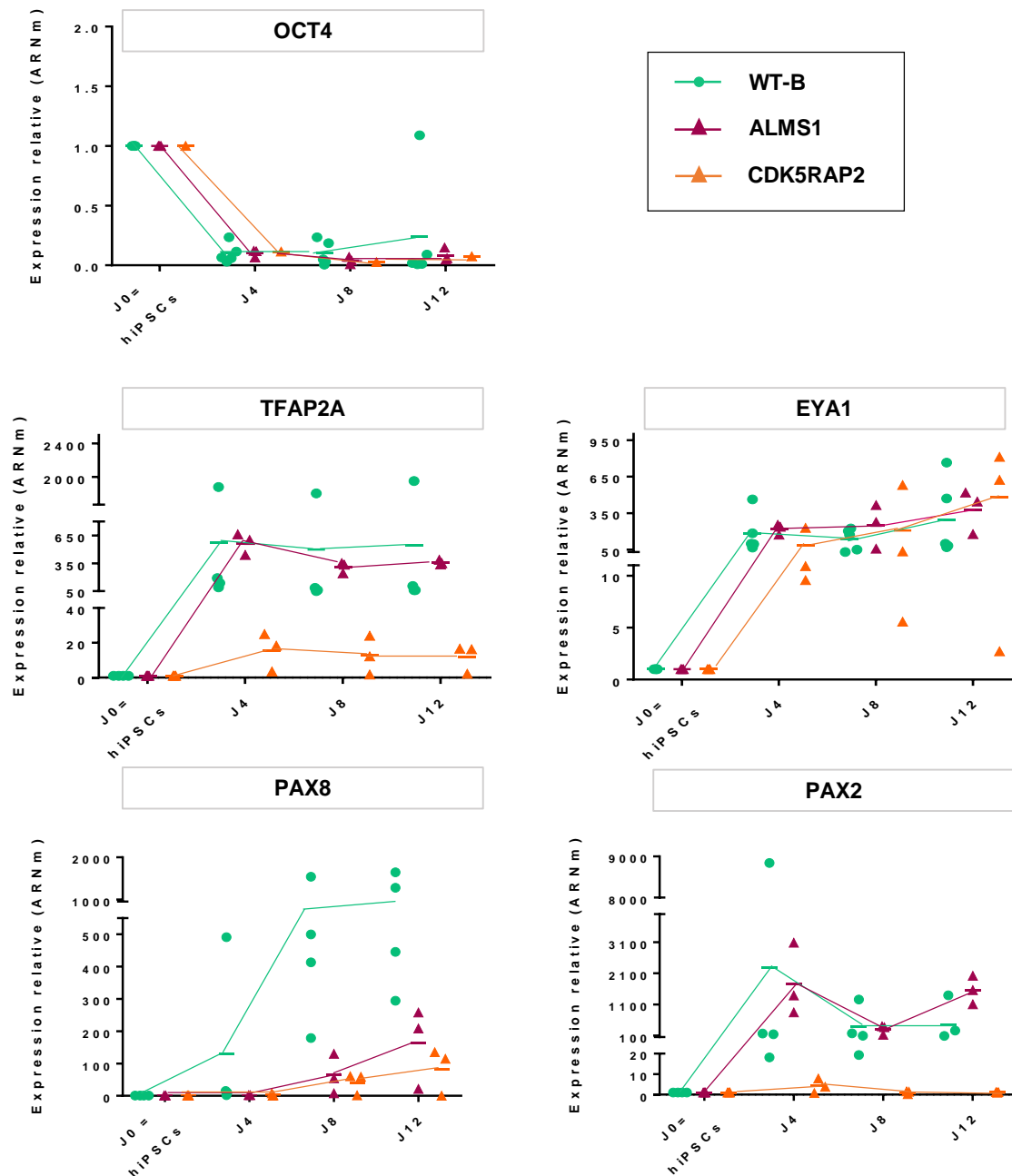
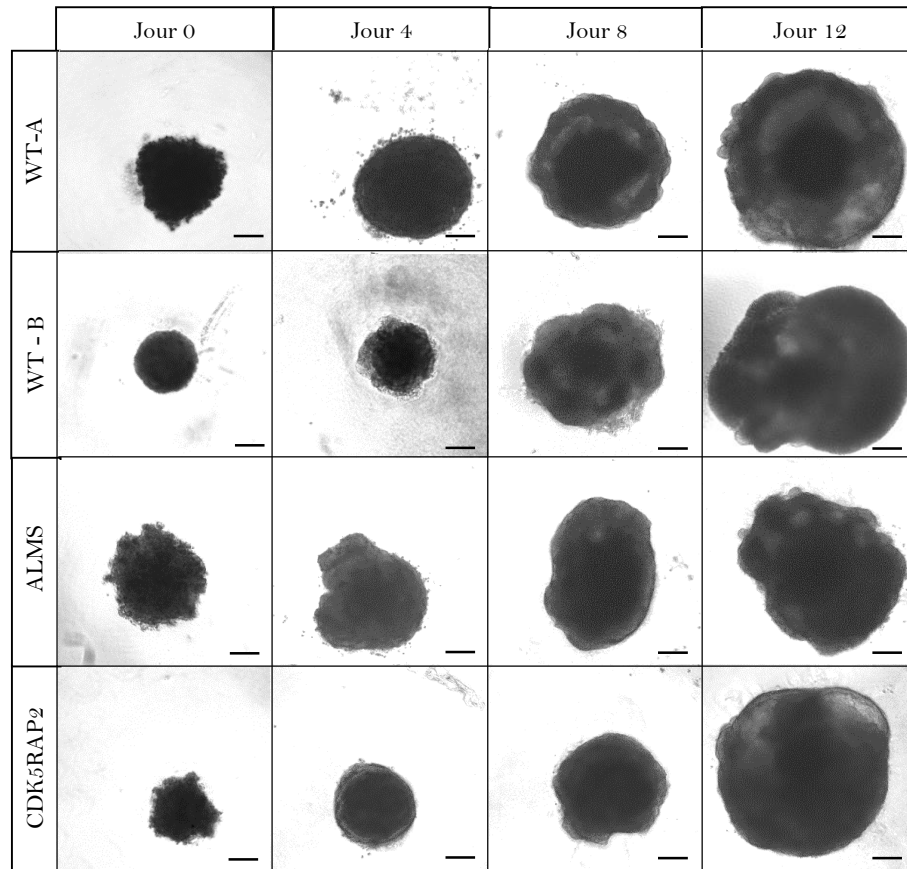


Figure 28 : Evolution de l'expression de gènes de pluripotence (OCT4) et marqueurs d'induction otique (TFAP2A, EYA1, PAX8 et PAX2) au cours des 12 premiers jours de différenciation 3D. A J0, les cellules sont encore au stade hiPSCs et expriment OCT4. Dès le début de la différenciation, le niveau d'OCT4 s'effondre alors que les marqueurs otiques commencent à apparaître et s'amplifient au cours du temps. L'ensemble des lignées présente le même profil d'expression, suggérant que les mutations d'ALMS1 et de CDK5RAP2 n'empêchent pas l'induction otique. Soulignons tout de même que la lignée CDK5RAP2 présente une plus faible expression des marqueurs otiques, excepté EYA1. Soulignons également que la variabilité inter-expérimentale au sein d'une même lignée s'explique au moins partiellement par la nécessité de grouper 6 à 12 organoïdes afin d'avoir suffisamment de matériel pour réaliser les RT-qPCR.

A



B

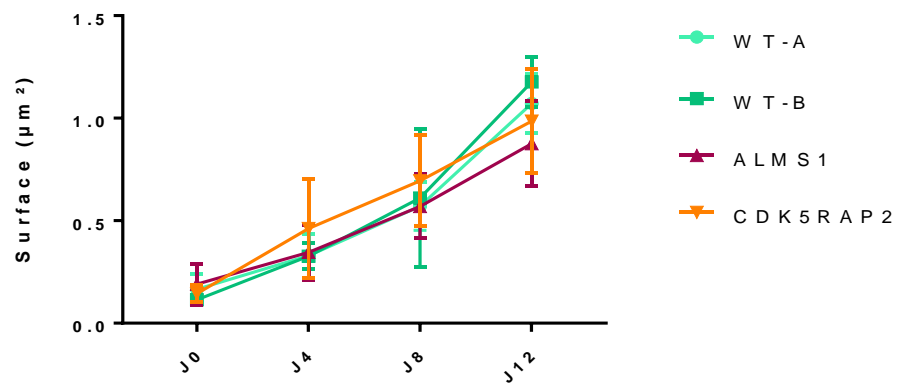
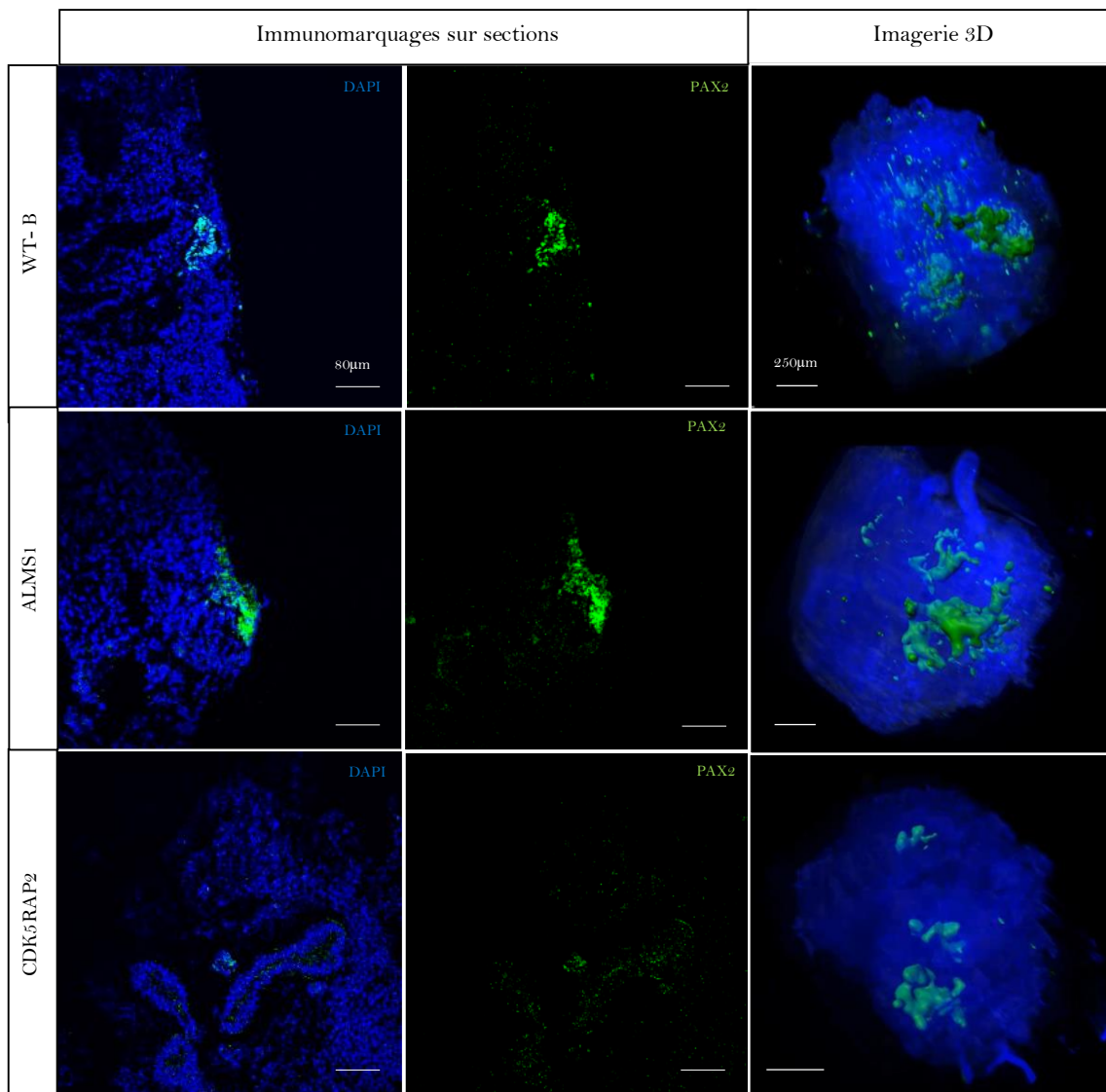


Figure 29 : La morphologie globale (A) et la taille (B) des organoïdes au cours des 12 premiers jours de différenciation sont similaires dans les lignées WT, ALMS1 et CDK5RAP2.

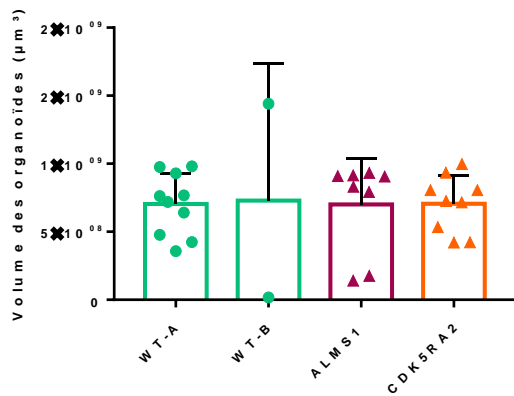
Nous nous sommes ensuite intéressés à la morphologie globale des organoïdes ainsi qu'à leur taille au cours des 12 premiers jours de différenciation car elles sont le reflet indirect de la capacité des cellules à proliférer (Figure 29). Bien que la taille initiale des organoïdes varie quelque peu en raison de l'approximation du comptage cellulaire et d'un taux de survie variable d'une expérience à l'autre, il n'y a pas de différence flagrante dans la morphologie ou dans la taille des organoïdes après 12 jours de différenciation. Nous pouvons conclure que les mutations d'*ALMS1* et de *CDK5RAP2* ne semblent pas impacter de façon significative les premières étapes d'induction otique.

Au fur et à mesure de l'avancement du protocole de différenciation, de plus en plus de types cellulaires s'organisent au sein des organoïdes. C'est pourquoi nous avons poursuivi la comparaison entre nos lignées WT, *ALMS1* et *CDK5RAP2* en réalisant à J18 des immunomarquages anti-PAX2, un marqueur de progéniteurs otiques (Koehler et al., 2017). D'abord réalisés sur des coupes d'organoïdes, ces marquages nous ont permis de constater la présence de cellules PAX2+ (Figure 30 A – Immunomarquages sur coupes). Cependant, comme ces cellules s'organisent en petites vésicules au sein des organoïdes, de nombreuses coupes ne traversent pas ces structures et sont donc négatives pour PAX2. Afin d'évaluer plus efficacement la présence de cellules PAX2+ ainsi que leur proportion dans les différentes lignées, nous avons réalisé des immunomarquages sur organoïdes entiers que nous avons ensuite imagés en 3D à l'aide du microscope à feuille de lumière (Figure 30 A – Imagerie 3D). Nous avons ainsi pu évaluer le volume total des organoïdes (Figure 30 B) mais également le pourcentage de ce volume occupé par le marquage PAX2 (Figure 30 C). Les mutations d'*ALMS1* et de *CDK5RAP2* n'altèrent pas le volume total des organoïdes, suggérant que les cellules n'ont pas de problème majeur de prolifération au cours des 18 premiers jours de différenciation. Sur ces images en 3D, nous avons pu apprécier la présence de puits otiques au sein des organoïdes dérivés de chacune des lignées. De plus, le volume occupé par les puits otiques ne diffère pas de façon significative entre nos différentes lignées, ce qui appuie une fois de plus le fait que les mutations étudiées n'interfèrent pas avec l'induction otique.

A



B



C

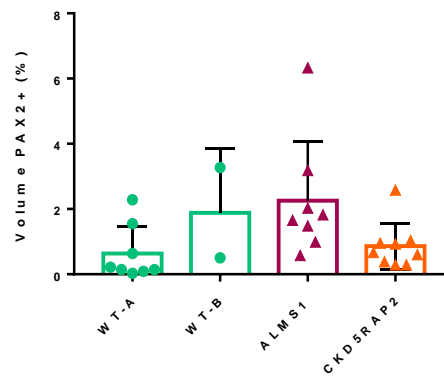


Figure 30 (page précédente) : Analyse comparative des lignées WT, ALMS1 et CDK5RAP2 par immunomarquages au jour 18 de différenciation. Les organoïdes WT, ALMS1 et CDK5RAP2 contiennent des ensembles de cellules positives pour PAX2 appelés puits otiques (A) (Echelle = 80µm (section) et 250µm (imagerie 3D)). Le volume total des organoïdes n'est pas modifié lorsque les gènes ALMS1 ou CDK5RAP2 sont mutés (B), suggérant qu'il n'y a pas de défaut majeur de la prolifération dans ces lignées (WT-A = $7,035 \times 10^8 \pm 2,26 \times 10^8 \mu\text{m}^3$; WT-B = $2,287 \times 10^8 \pm 1,01 \times 10^8 \mu\text{m}^3$; ALMS1 = $7,001 \times 10^8 \pm 3,38 \times 10^8 \mu\text{m}^3$; CDK5RAP2 = $7,065 \times 10^8 \pm 2,09 \times 10^8 \mu\text{m}^3$). La proportion du volume occupé par les puits otiques est également similaire, ce qui suggère que l'induction otique n'est pas affectée par la mutation l'ALMS1 et de CDK5RAP2 (WT-A = $0,636 \pm 0,834\%$; WT-B = $1,885 \pm 1,960\%$; ALMS1 = $2,259 \pm 1,814\%$; CDK5RAP2 = $0,928 \pm 0,705\%$).

5.2. Phase de maturation des organoïdes

Comme évoqué précédemment, la phase de maturation permet l'auto-organisation des différentes populations cellulaires au sein des organoïdes et la sécrétion par ces cellules de facteurs nécessaires à la différenciation des progéniteurs otiques en cellules ciliées. L'équipe du Dr. Hashino ayant observé des cellules ciliées après 42 jours de maturation (soit au jour 60 de la différenciation), nous avons réalisé des immunomarquages sur coupes d'organoïdes aux jours 68 (Figure 31) et 125 de différenciation (Figure 32). Pour les trois lignées étudiées, nous avons pu détecter à J68 certaines cellules exprimant POU4F3, un facteur de transcription exprimé spécifiquement dans les cellules ciliées même immatures, au voisinage desquelles d'autres cellules exprimaient SOX2 (Figure 31). Au cours du développement otique, SOX2 est présent dans les progéniteurs du domaine prosensoriel, puis son expression diminue progressivement au cours de la différenciation terminale en cellule ciliée tandis qu'elle sera maintenue dans les cellules qui adopteront plus tard un destin de cellules de soutien. Dès lors, les cellules qui co-expriment POU4F3 et SOX2 (flèches jaunes) constituent vraisemblablement des cellules ciliées au début de leur processus de différenciation, tandis que les cellules exprimant uniquement SOX2 seraient des cellules de soutien en devenir. A ce stade, aucune cellule positive pour la MYOSINE 7A, une protéine exprimée plus tardivement dans les cellules ciliées, n'a été observée..

Au sein des organoïdes, nous retrouvons également des fibres nerveuses exprimant la TUBULINE-βIII (TUJ1) (Figures 31 et 33). L'ensemble de ces résultats suggèrent que les mutations d'ALMS1 et de CDK5RAP2 n'empêchent ni la formation de cellules sensorielles otiques ni le développement de neurones.

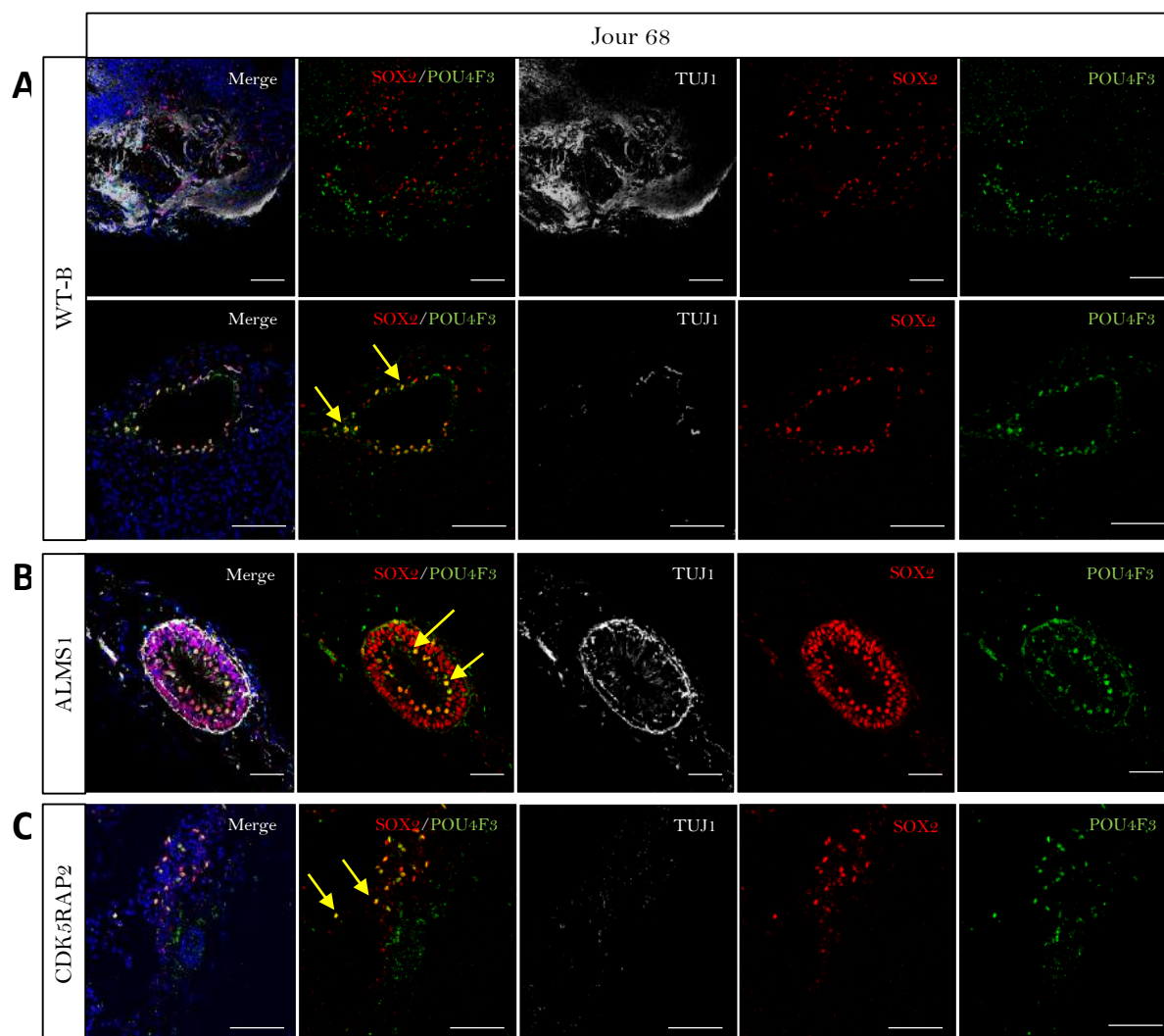


Figure 31 : Analyse comparative des lignées WT-B (A), ALMS1 (B) et CDK5RAP2 (C) par immunomarquages au jour 68 de différenciation. Les lignées WT-B, ALMS1 et CDK5RAP2 sont capables de générer des cellules exprimant POU4F3 (marqueur de cellules ciliées précoces) ainsi que SOX2 (marqueur des progéniteurs otiques dont l'expression se restreint ensuite aux cellules de soutien). De plus, certaines cellules co-expriment SOX2 et POU4F3 (identifiées par des flèches jaunes), ce qui indique que les cellules ciliées sont encore très précoces. A ce stade, aucune cellule exprimant la MYOSINE 7A (MYO7A), un marqueur plus tardif, n'a été observée. Notons également la présence de fibres nerveuses, visibles grâce au marquage de la TUBULINE β -III (TUJ1).

Vingt jours plus tard (J88), quelques cellules positives pour MYO7A - un marqueur plus tardif de cellules ciliées - sont observées dans les lignées WT-B (Figure 32) mais pas dans les lignées ALMS1 et CDK5RAP2. Au jour 125 de différenciation cependant, de nombreuses cellules MYO7A positives organisées en rosette sont visibles sur les coupes d'organoïdes ALMS1 (Figure 33 A). Notons que la plupart de ces cellules MYO7A positives conservent une expression soutenue du

facteur SOX2 (flèches jaunes), ce qui suggère que la maturation des cellules ciliées est toujours en cours. Il existe cependant des régions où les cellules ciliées semblent avoir atteint leur maturité puisqu'elles sont totalement dépourvues du marqueur SOX2 (flèches blanches). Ce degré de maturité variable au sein des organoïdes est en accord avec celui observé au cours du développement embryonnaire de l'organe de Corti. En effet, la différenciation physiologique des cellules sensorielles s'étale sur plusieurs jours en démarrant de la base de la cochlée pour s'étendre progressivement vers l'apex.

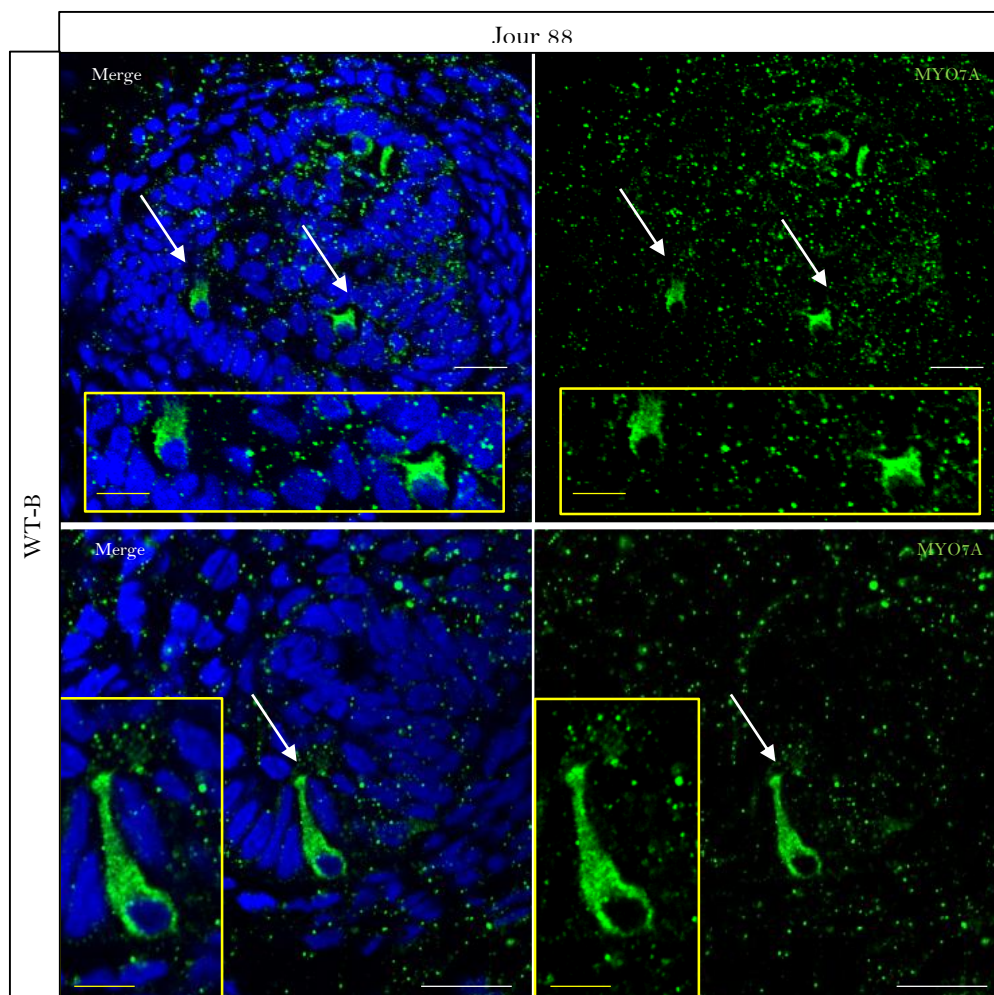
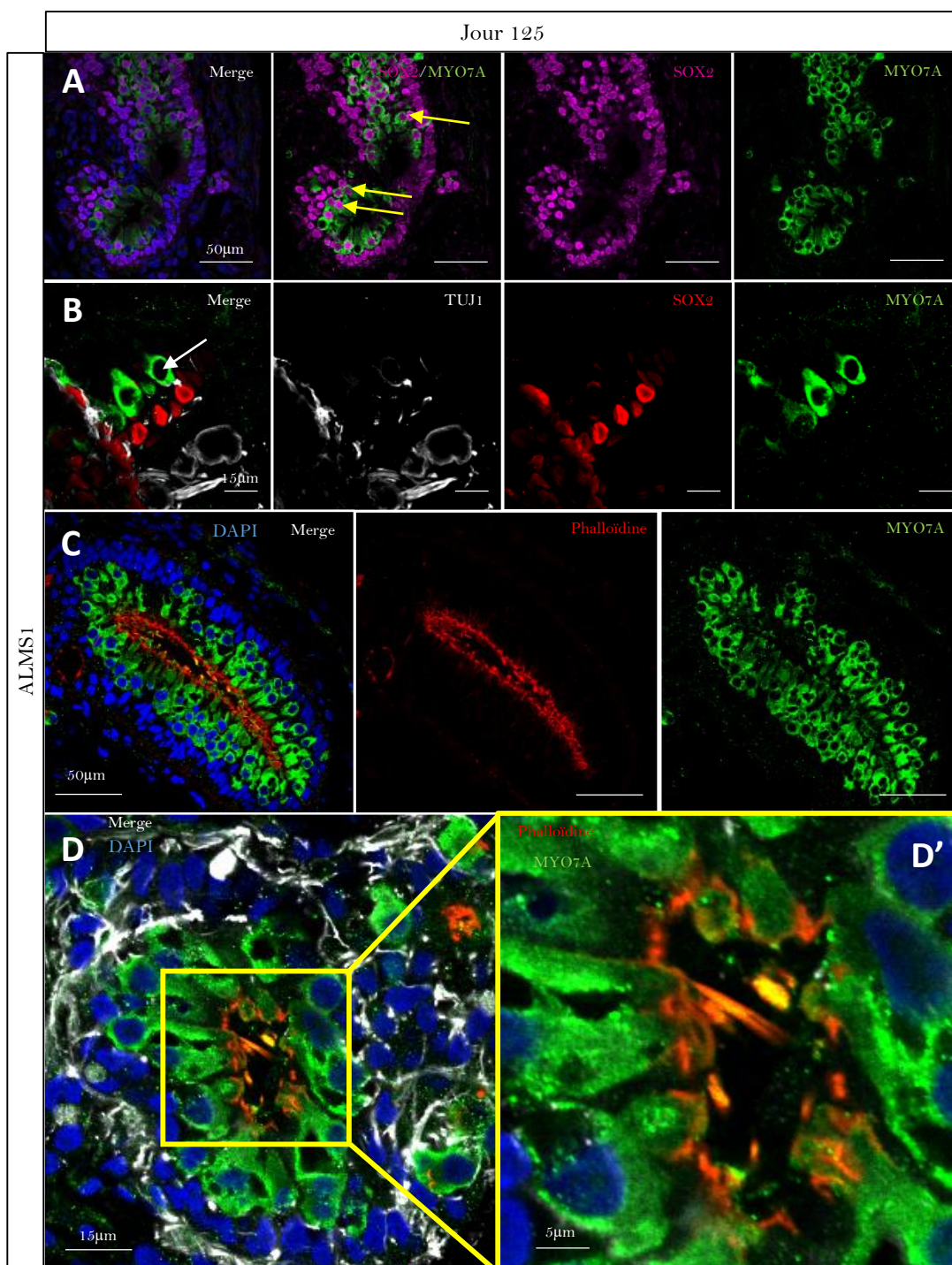


Figure 32 : Présence de quelques cellules MYOSINE 7A positives après 88 jours de différenciation dans les organoïdes WT-B. Les rectangles jaunes sont des agrandissements des images. Echelles : 20 μ m (blanc) et 10 μ m (jaune).

A J125, des cellules ciliées plus matures exprimant uniquement MYO7A sont entourées de cellules SOX2-positives et sont connectées par des fibres nerveuses marquées pour TUBULINE- β III (Figure 33 B). Cette organisation est tout à fait similaire à celle de l'organe de Corti au sein

duquel les cellules ciliées reposent sur les cellules de soutien (SOX2 positives) et sont innervées par les neurones du ganglion spiral (TUJ1 positifs). On retrouve à la surface de ces cellules des structures riches en actine, mises en évidence par de la phalloïdine couplée à un fluorochrome. Ces extensions cytoplasmiques constituent la touffe stéréociliaire typique des cellules ciliées (Figure 33 C, D et D').



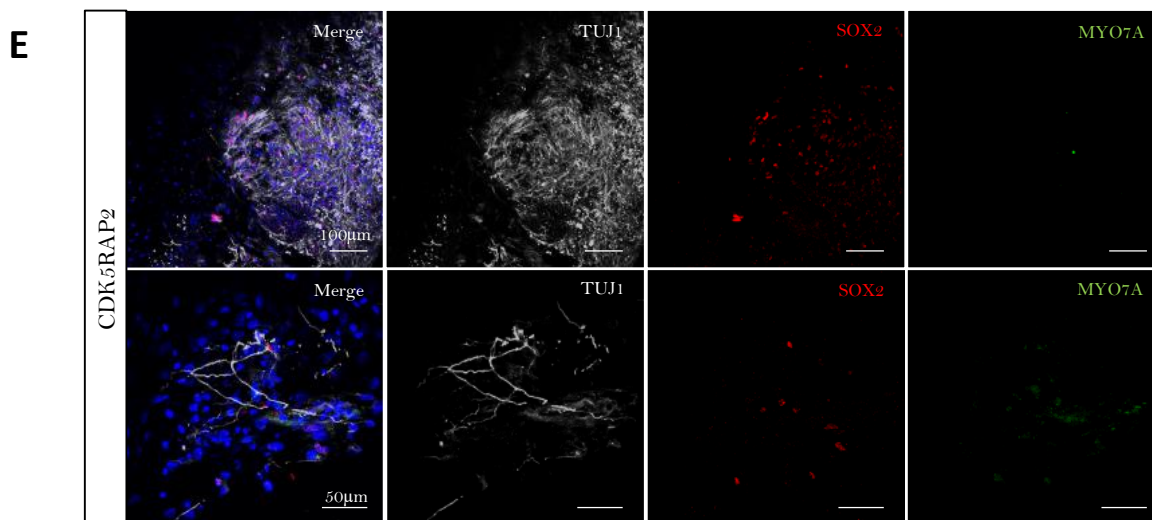


Figure 33 : Analyse par immunomarquage des organoïdes *ALMS1* (A-D') et *CDK5RAP2* (E) au jour 125 de différenciation. Des structures composées de nombreuses cellules *MYO7A*+ (flèches blanches) et *MYO7A*+/*SOX2*+ (flèches jaunes) sont observées dans les organoïdes *ALMS1* (A), représentant des cellules ciliées plus ou moins matures. Les cellules *MYO7A*+ sont en effet plus matures que les cellules *MYO7A*+/*SOX2*+. Cette coexistence de cellules à divers degrés de maturité est également présente au cours du développement physiologique de l'oreille interne. Certaines cellules *MYO7A* reposent sur des cellules de soutien *SOX2*+ et sont connectées par des fibres nerveuses (B) suivant une organisation très similaire à ce qui peut être observé sur une coupe transversale de cochlée. De plus, ces cellules possèdent à leur surface apicale une structure enrichie en actine mise en évidence par de la phalloïdine couplée à un fluorochrome : la touffe stéréociliaire (C-D'). Aucune cellule *MYO7A*+ n'a été détectée dans les organoïdes *CDK5RAP2*, et ce malgré la présence de quelques cellules *SOX2*+ et de fibres nerveuses (E).

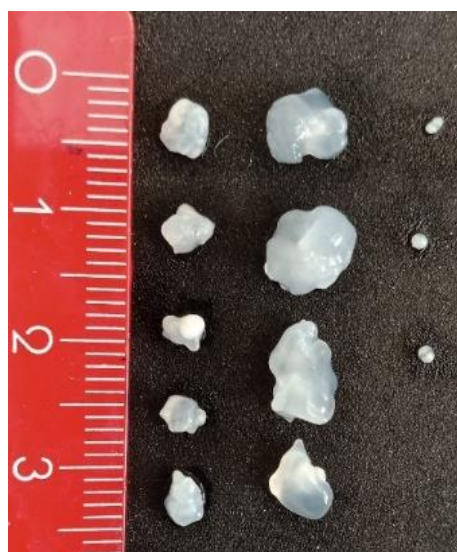


Figure 34 : Image représentative des organoïdes au jour 125 de différenciation. A= *WT*-B ; B = *ALMS1* ; C= *CDK5RAP2*.

Alors que certaines fibres nerveuses et quelques cellules SOX2+ ont été détectées au sein des organoïdes mutés pour *CDK5RAP2* à J125, des structures composées de cellules MYO7A+ n'ont jamais été observées (Figure 33 E). Soulignons également que si la taille des organoïdes *CDK5RAP2* n'est pas impactée au jour 12 (Figure 29 B) ou 18 (Figure 30 B) de différenciation, leur taille est drastiquement réduite au jour 125 (Figure 34). Dès lors, la perte de *CDK5RAP2* compromet fortement le développement des organoïdes aux stades plus tardifs, correspondants à la période de différenciation des cellules de l'organe de Corti. Notons également que si les organoïdes *ALMS1* sont plus gros que les organoïdes WT-B, cela ne semble pas être le cas lorsqu'ils sont comparés avec des organoïdes issus des hiPSCs WT-C ou D. Nous devons cependant réitérer plusieurs fois les différenciations avec ces nouvelles lignées avant de pouvoir les inclure dans nos résultats.

5.3. Optimisation de la maturation des organoïdes

Notre méthode actuelle de maintenance des organoïdes n'est pas optimale pour la culture à long terme. La manipulation très régulière engendrée par les changements de milieu couplée à la culture sans antibiotiques de nos organoïdes augmentent le risque de contamination à long terme par des micro-organismes. Après « seulement » 125 jours en culture, les organoïdes ont une taille conséquente et consomment rapidement les nutriments du milieu de culture, ce qui nous oblige à changer plus souvent et en plus grande quantité le milieu, au risque d'éliminer des facteurs essentiels à la différenciation en cellules ciliées. Finalement, nous observons une évaporation dans les puits situés en bord de plaque 24 puits, ce qui peut être source de variabilité. Il existe sur le marché un bioréacteur spécifiquement conçu pour la culture des organoïdes (CERO - OLS) que nous avons eu la chance d'avoir en démonstration au laboratoire. Plusieurs organoïdes y sont cultivés dans un seul tube contenant un large volume de milieu, ce qui réduit le nombre de changement de milieu et le risque de contamination. Un système rotatif unique à vitesse adaptable permet de maintenir les organoïdes en suspension dans le milieu et de favoriser ainsi les échanges entre les organoïdes et le milieu de culture. Dans le cadre de notre étude, nous y avons placé les organoïdes en phase de maturation et avons réalisé des immunomarquages sur coupe d'organoïdes à J60. Nous avons noté la présence de vésicules clairement définies dont la structure n'est pas sans rappeler une coupe transversale de cochlée contenant un grand nombre de cellules SOX2 positives ainsi que plusieurs cellules positives pour les marqueurs de cellules ciliées POU4F3 ou MYOSINE7A (Figure 35). Un enrichissement en actine est visible à la surface apicale des cellules MYOSINE7A+, évoquant la touffe stéréociliaire. L'utilisation d'un bioréacteur tel que le CERO nous a permis de réduire de moitié le temps nécessaire à la différenciation en cellules ciliées, passant

de 125 à 60 jours de différenciation et se rapprochant ainsi du temps requis au cours de l'embryogenèse pour former les cellules ciliées.

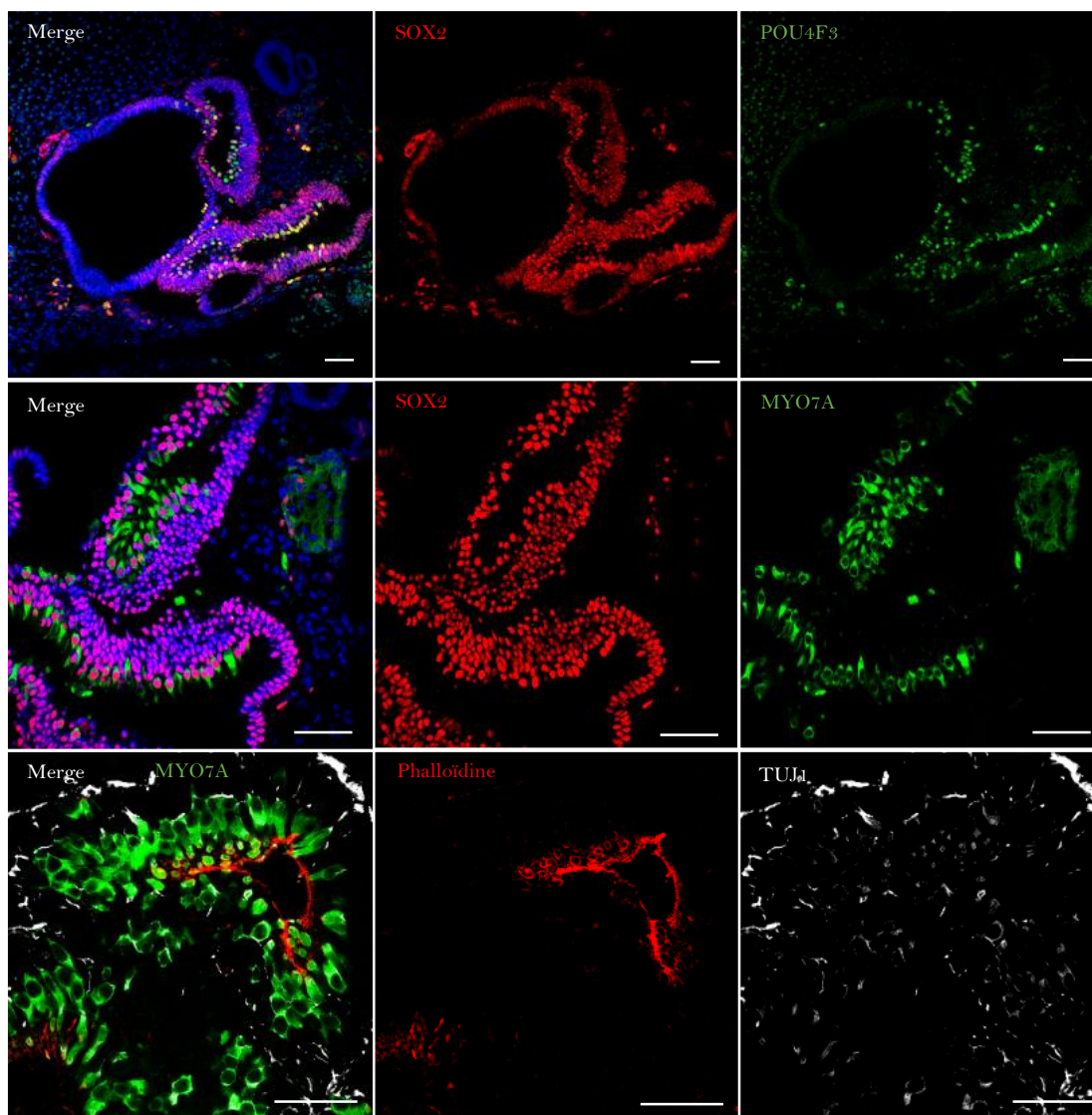
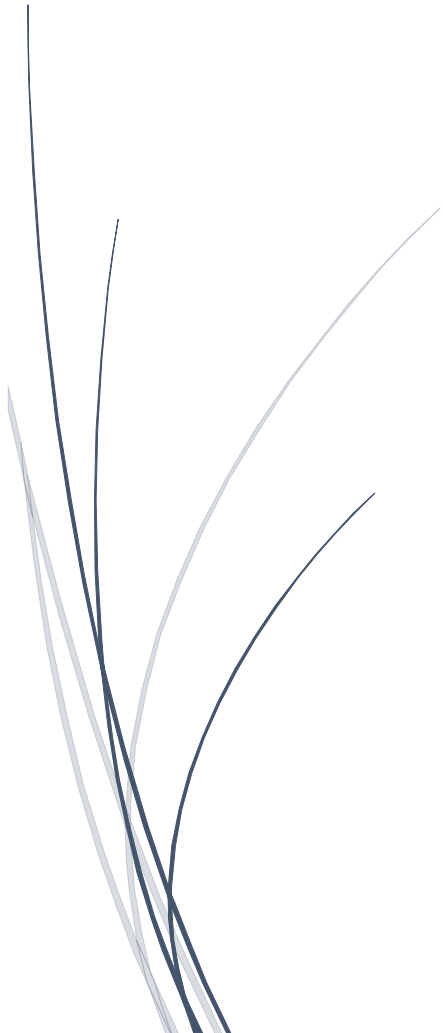


Figure 35 : Analyse par immunomarquages de coupe d'organoïdes ALMS1 à J60 après 40 jours de maturation dans le bioréacteur CERO. De belles vésicules nettement définies sont visibles. L'organisation cellulaire rappelle celle de l'épithélium sensoriel de l'oreille avec des cellules POU4F3 ou MYOSINE7A+ reposant sur des cellules SOX2+. La surface apicale des cellules MYOSINE7A+ est enrichie en actine mise en évidence par de la phalloïdine couplée à un fluorochrome, possiblement une touffe stéréociliaire. Quelques fibres nerveuses connectant les cellules ciliées sont également visibles. L'utilisation d'un bioréacteur permet donc d'obtenir des résultats similaires à ceux observés en condition de culture classique mais dans un laps de temps réduit de 50%.

*Discussion
et
perspectives*



La surdité est un problème de santé majeur affectant un nombre croissant d'individus. Parmi les facteurs mis en cause, la génétique joue un rôle prépondérant. Isoler les mécanismes sous-jacents est essentiel à la compréhension de la pathologie, mais également à la conception de traitements adaptés. Pour cela, la mise au point et l'utilisation de modèles adéquats sont primordiales. A ce jour, de nombreux modèles impliquant les animaux existent (Friedman et al., 2007), mais transposer les connaissances acquises chez l'animal à l'Homme échoue bien souvent (Mak et al., 2014; Martignoni et al., 2006). C'est pourquoi, il est capital de confirmer les résultats obtenus à partir d'un modèle animal dans un modèle humain. Au cours de notre étude, nous avons choisi d'utiliser et de différencier les hiPSCs en cellules otiques pour tenter de comprendre les mécanismes impliqués dans des surdités d'origine génétique liées à des défauts de protéines centrosomales. A cette fin, nous avons reprogrammé avec succès des fibroblastes provenant d'un patient sourd porteur d'une mutation homozygote récessive du gène *ALMS1* et atteint du syndrome d'Alström, et d'un patient sourd souffrant d'une MCPH secondaire à la mutation composite du gène *CDK5RAP2*. Nos résultats concernant la différenciation de ces hiPSCs suggèrent un développement normal des progéniteurs otiques (OSCs) malgré la mutation des gènes *ALMS1* et *CDK5RAP2*. La différenciation terminale en cellules ciliées n'a été possible que dans la lignée *ALMS1*. Les résultats sont récapitulés en Table 5 avant d'être discutés.

Table 5 : Résumé des résultats obtenus au cours de ce projet.

		Mutation de <i>CDK5RAP2</i>	Mutation d' <i>ALMS1</i>
Analyse de l'expression des protéines	<i>CDK5RAP2</i> (IF)	X	✓
	<i>ALMS1</i> (IF)	✓	X
	<i>CNAP1</i> (IF)	↘	↘
	<i>ROOTLETINE</i> (IF)	✓	✓
	γ - <i>TUBULINE</i> (IF et WB)	↘	✓
Distance intercentriolaire (cellules hors mitose)		✓	↗
Taille des organoïdes	J12	✓	✓
	J125	↘	✓
Prolifération (Ki67, BrdU)		↘	✓

		Mutation de CDK5RAP2	Mutation d'ALMS1
Capacité à se différencier	en OSCs	✓	✓
	en CCs matures	✗	✓

1. Les hiPSCs peuvent être dérivées en cellules otiques suite à l'application de protocoles de différenciation dont l'efficacité est augmentée en culture 3D.

Nous avons commencé par appliquer un protocole de différenciation 2D à nos lignées hiPSCs afin de les dériver en progéniteurs otiques (OSCs). Ce protocole a été mis au point au laboratoire par le Dr. Benjamin Grobarczyk au cours de sa thèse (Figure 36 A), et s'inspire de la littérature qui était alors disponible (Oshima et al., 2010a; Ronaghi et al., 2014). A la fin du traitement, nous avons observé une expression d'*ETAI* (par RT-qPCR), de *SIX1* et de *PAX2* (par RT-qPCR et immunomarquages) dans nos cultures d'OSCs. *ETAI* est un co-activateur transcriptionnel exprimé dans les placodes ectodermes et impliqué dans la modulation de l'expression du facteur de transcription *SIX1*. Ensemble, ils interviennent dans l'établissement des destins otiques et épibranchiaux (Zou et al., 2004). Il a été démontré que *Eya1* fonctionne en synergie avec *Pax2* durant la morphogenèse de l'oreille interne des mammifères (Zou et al., 2006) mais également que *Eya1* et *Six1* induisent et soutiennent la différenciation en cellules ciliées via l'activation de l'expression d'*Atoh1* (Ahmed et al., 2012; Bricaud et al., 2006). Néanmoins, bien que nos OSCs expriment plusieurs marqueurs de progéniteurs otiques, nous avons fait face à de grandes difficultés pour les différencier en cellules ciliées. Notre protocole de différenciation repose sur le sevrage en facteurs de croissance des OSCs et la co-culture, durant 10 jours, avec des cellules nourricières provenant de la dissection de cochlées murines à E14,5. L'ajout de molécules décrites dans la littérature comme favorisant la différenciation des progéniteurs otiques en cellules ciliées (e.g. acide rétinoïque (Lefebvre et al., 1993; Rubbini et al., 2015); EGF (Ding et al., 2016; Doetzelhofer et al., 2004; Tang et al., 2016) et inhibiteurs de la voie Notch (Luo et al., 2017; Mizutani et al., 2013)) n'a pas permis d'augmenter l'efficacité du protocole, de même que la co-culture avec d'autres types de cellules nourricières issues d'utricules de souris ou de poulet.

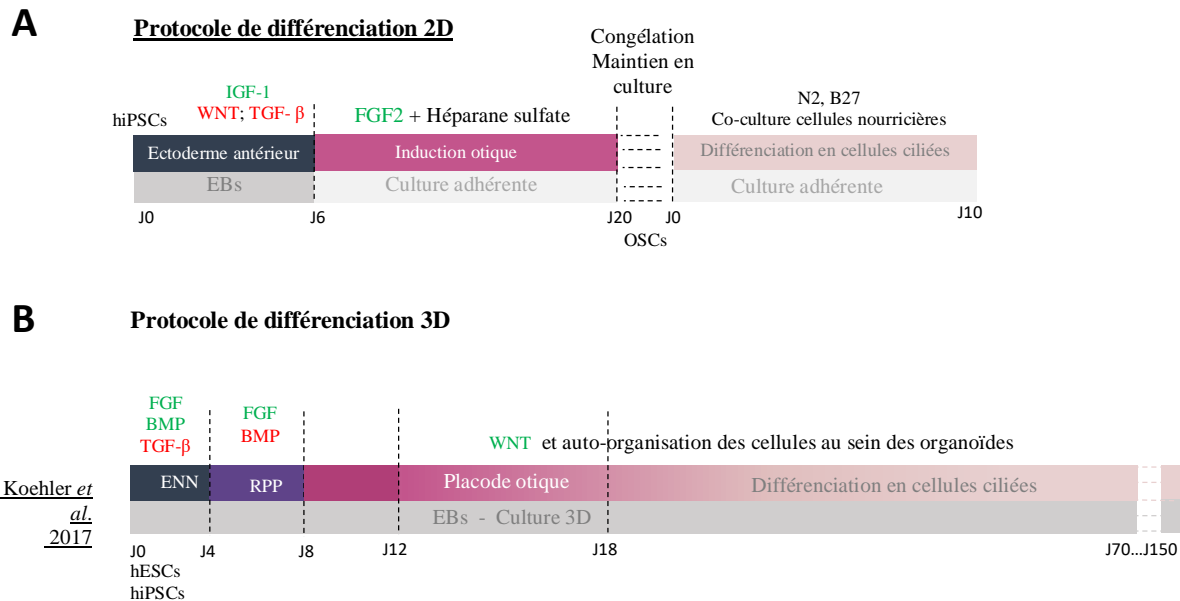


Figure 36 : Schéma comparatif des protocoles de différenciation 2D (A) et 3D (B) des hiPSCs en cellules ciliées.

Nous nous sommes dès lors tournés vers un protocole de différenciation 3D des hiPSCs en cellules otiques (Figure 36 B) ayant abouti à des résultats prometteurs (Koehler et al., 2017). L'idée d'utiliser les cultures 3D pour améliorer la différenciation en cellules ciliées est apparue après la publication de résultats incroyables décrivant la formation de cupules optiques dérivées de mESCs et hESCs en cultures flottantes (Eiraku et al., 2008, 2011; Nakano et al., 2012). Peu de temps après, un premier protocole de différenciation des mESCs en cellules ciliées a été mis au point par l'équipe du Dr. Hashino. Il se base sur la modulation des voies de signalisation connues pour être critique dans le développement cochléaire chez la souris, avec dans un premier temps l'inhibition de la voie TGF- β et l'activation de la voie BMP afin de pousser les mESCs à donner naissance à de l'ectoderme non-neural. L'activation de la voie FGF couplée à l'inhibition de la voie BMP permet alors la différenciation en cellules pré-placodales, les précurseurs de l'ensemble des placodes crâniennes. Finalement, l'activation de la voie WNT dirige les cellules vers un destin otique (Koehler et al., 2013; Liu et al., 2016; Longworth-Mills et al., 2016; Nie et al., 2017). Récemment, l'équipe du Dr. Hashino a adapté ce protocole afin de différencier des cellules souches humaines (hESCs et hiPSCs) en cellules ciliées (Koehler et al., 2017). Si les voies de signalisation modulées sont similaires, le timing des traitements est modifié afin de correspondre au mieux au développement cochléaire humain. Ainsi, les premières étapes du protocole de différenciation consistant à moduler les voies de signalisation durent au total 18 jours : nous l'appelons « phase d'induction ». Vient ensuite une période de 42 à 132 jours au cours

de laquelle les cellules s'auto-organisent et sécrètent les facteurs essentiels à leur différenciation terminale, que nous appelons « phase de maturation ». Au cours de la phase d'induction, nous avons observé une diminution systématique de l'expression des marqueurs de pluripotence associée à l'expression croissante de marqueurs otiques. Cependant, les niveaux d'expression mesurés sont très variables d'une expérience à l'autre. Ceci peut s'expliquer par la nécessité de grouper plusieurs organoïdes afin de récolter suffisamment de matériel pour pouvoir réaliser l'analyse. Si l'un d'eux est mal engagé dans la différenciation otique, cela se reflète sur les niveaux d'expression des gènes évalués. Au-delà de la sensibilité intrinsèque des organoïdes au traitement de différenciation, nous avons également constaté une évaporation accrue du milieu de culture dans les puits périphériques de nos plaques 96 puits « ultra-low » adhérence, ce qui modifie la concentration des molécules utilisées pour moduler les différentes voies de signalisation en plus de diminuer l'apport nutritif des cellules. Rajouter du milieu est délicat puisque nous ignorons la vitesse à laquelle sont consommés les morphogènes. Nous risquerions donc de modifier la différenciation. Une solution consisterait à remplir les puits périphériques avec du milieu sans y placer d'agrégats, mais cela constitue une perte de 36 puits sur 96, soit presque 40% de la plaque. Durant la phase de maturation, les organoïdes sont placés dans des plaques 24 puits de type « ultra-low » adhérence. Nous avons choisi de changer une partie du milieu tous les deux jours, ce qui permet d'apporter les nutriments nécessaires à la survie et la croissance cellulaire tout en conservant une partie des facteurs sécrétés par les cellules dans le milieu de culture. Entre les jours 60 et 75, Koehler et al. observent des fibres nerveuses, ce que nous avons également pu observer à partir du jour 68 de différenciation. Ils constatent également la présence de cellules exprimant la MYOSINE7A et présentant à leur surface apicale une structure riche en actine et positive pour l'ESPINE : la touffe stéréociliaire (Koehler et al., 2017). Au jour 68 de différenciation, nous n'avons pas détecté de cellules positives pour MYOSINE7A. Les immunomarquages révèlent néanmoins la présence de cellules positives pour SOX2, un marqueur de progéniteurs otiques dont l'expression finit par se restreindre aux cellules de soutien au cours du développement, et d'autres exprimant POU4F3. Ce dernier est un facteur de transcription jouant un rôle majeur dans le développement des cellules ciliées murines et humaines (Hertzano et al., 2004; Zhong et al., 2019) dont l'expression est activée par ATOH1. Il semble donc que nous ayons des cellules ciliées précoces dans nos cultures à J68. Vingt jours plus tard (soit au jour 88 de différenciation), nous avons pu observer des cellules positives pour MYOSINE7A. Ce décalage de maturation des cellules ciliées dans nos cultures comparativement aux résultats obtenus par Koehler *et al.* peut résulter d'une sensibilité intrinsèque spécifique à chaque lignée hiPSCs, qui a également été notée par l'équipe du Dr. Hashino. Il est également possible que les remplacements trop réguliers de milieu éliminent une partie des facteurs essentiels à la différenciation en cellules ciliées et, secondairement, ralentissent le processus de différenciation.

Ces résultats démontrent que les conditions de culture peuvent grandement influencer l'efficacité de la différenciation en cellules otiques. Si le protocole de culture en 2D a permis d'obtenir une culture riche en OSCs (plus de 80% après passage), la différenciation terminale en cellules ciliées était peu performante. L'ajout d'une étape d'activation de la voie Wnt dans le but d'engager les cellules progénitrices des placodes postérieures vers un destin otique (Freter et al., 2012) pourrait favoriser l'émergence de cellules ciliées. De plus, les connaissances encore limitées des voies de signalisation nécessaire à la différenciation des progéniteurs otiques en cellules ciliées nous obligent à utiliser des cellules nourricières afin de fournir ces facteurs essentiels à nos OSCs. Ces cellules proviennent de la dissection de plusieurs structures (cochlées ou utricules) animales, ce qui induit une source de variabilité conséquente provenant de la précision de la dissection, du temps fluctuant nécessaire à la remise en culture (dépendant notamment du nombre d'embryons utilisés), du taux de survie et de la vitesse de prolifération des cellules, mais également de l'imprécision de l'âge des animaux utilisés (estimée à une demi-journée près).

L'application d'un protocole de différenciation 3D a significativement augmenté l'efficacité et la reproductibilité de l'obtention de cellules ciliées à partir d'hiPSCs. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette amélioration notable. Dans un premier temps, le protocole 3D utilisé suit au plus près les connaissances actuelles des voies de signalisation impliquées dans le destin otique. Leur modulation s'étale également sur une période plus proche de celle naturellement nécessaire à la formation des cellules ciliées au cours du développement embryonnaire humain. En effet, l'équipe du Dr. Hashino considère que les hiPSCs correspondent à des cellules épiblastiques présentes au jour 12 du développement embryonnaire humain (Koehler et al., 2017), et ils voient des cellules ciliées après 60 jours de différenciation, ce qui correspond donc à un total d'environ 72 jours. Or, le temps nécessaire à l'apparition des premières cellules ciliées au cours de l'embryogenèse humaine est de l'ordre de 10 semaines de gestation, soit 70 jours (Lim and Brichta, 2016). Notons également que ce protocole a l'avantage de ne pas faire intervenir de cellules animales. Les facteurs sécrétés nécessaires à la différenciation en cellules ciliées sont donc d'origine humaine. De plus, les nombreuses sous-populations cellulaires qui se développent au sein des organoïdes sont libres de s'y organiser spontanément pour former des structures similaires à celles observées au cours du développement embryonnaire de l'oreille interne.

Considérées dans leur ensemble, ces informations démontrent la pertinence de l'utilisation d'un modèle en 3D. Soulignons néanmoins que ce protocole peut lui aussi être optimisé grâce à la maturation des organoïdes en bioréacteur CERO (Bioké, Belgique) que nous avons eu la chance d'avoir en

démonstration au laboratoire. Complètement autonome, ce bioréacteur est un véritable incubateur permettant la culture d'un grand nombre d'organoïdes dans des tubes d'une contenance de 50ml. Un système de rotation innovant conserve les tubes en mouvement ; ce qui, couplé à la forme optimisée des tubes, permet de maintenir les organoïdes en suspension. Les échanges avec le milieu de culture sont améliorés, et les changements de milieu sont moins fréquents. Cela diminue drastiquement les risques de contamination par des micro-organismes inhérents à la culture sur le long terme, et permet de concentrer les facteurs de différenciation dans le milieu. L'utilisation de ce bioréacteur nous a ainsi permis de réduire de moitié le temps nécessaire à la différenciation des hiPSCs ALMS1, passant de 125 à 60 jours.

La compréhension des mécanismes précis impliqués dans la différenciation embryonnaire humaine des progéniteurs en cellules ciliées est primordiale pour développer et améliorer les modèles d'étude *in vitro*. L'essor des nouvelles technologies est un support inestimable à la mise en place de modèles humains. Elles offrent la possibilité de perfectionner les méthodes actuellement en vigueur mais également la perspective de nouvelles expériences tel que le maintien à très long terme des cultures et l'établissement de nouveaux modèles d'étude. En effet, bien que nous n'ayons pas fait une caractérisation exhaustive des types cellulaires contenus dans les organoïdes, nous avons pu observer des neurones dont les fibres viennent connecter les cellules ciliées. La culture 3D est dès lors un modèle prometteur offrant la possibilité d'étudier les interactions entre plusieurs populations cellulaires, et notamment la formation de synapses.

2. La localisation centrosomale d'ALMS1 et de CDK5RAP2 est perdue dans les cellules dérivées de patients.

Nous avons confirmé par immunomarquages la localisation centrosomale des protéines ALMS1 et CDK5RAP2 dans les fibroblastes, les hiPSCs et les OSCs issus de patients sains. En revanche, ces protéines n'ont pas été détectées au niveau des centrosomes de cellules dérivées des patients. Les mutations étudiées au cours de ce travail induisent des codons STOP prématurés conduisant à la production de protéines tronquées, nous ne pouvons donc pas exclure la présence de protéines résiduelles qui ne seraient pas détectées par nos anticorps spécifiques. En effet, les immunomarquages CDK5RAP2 ont été effectués à l'aide d'un anticorps dirigé contre la séquence peptidique 1361 à 1371 de la protéine, c'est-à-dire en aval d'une des mutations présentes chez notre patient. De même, l'anticorps utilisé pour détecter ALMS1 (Abcam – ab84892) est dirigé contre la séquence d'acides aminés 1200 à 1250 de la protéine, c'est-à-dire en aval du codon STOP prématuré. La littérature actuelle établie chez l'Homme et l'animal soutient d'ailleurs l'hypothèse de l'existence

d'une forme tronquée d'ALMS1 chez les patients. Il existe à ce jour trois constructions murines développées dans le but premier de comprendre les causes de l'obésité et des problèmes rénaux présents chez les patients atteints du syndrome d'Alström. La lignée de souris *Alms1^{Foz/Foz}* est porteuse d'une mutation apparue spontanément dans l'exon 8 ; la lignée *Alms1^{L213X/L213X}* est porteuse d'une mutation non-sens induite dans l'exon 10 et les souris *Alms1^{-/-}* ont été générées par insertion d'une cassette LacZ dans l'intron 13 (Hearn 2019). Ces modèles ont été construits de façon à entraîner la perte de la partie C-terminale de la protéine ALMS1, comme ce qui est observé chez l'Homme. Les résultats démontrent que les cils se développent normalement, mais qu'ils finissent par dégénérer entre P5 et P21 au sein des neurones hypothalamiques impliqués dans la satiété (Heydet et al. 2013) ainsi que dans certaines cellules des tubules proximaux du rein dans des animaux âgés de 6 mois (Li et al. 2007). De façon similaire, les fibroblastes humains mutés pour ALMS1 ne semblent pas présenter de défaut de ciliogenèse (Chen et al., 2017; Collin et al., 2012), tandis que la déplétion aiguë d'*ALMS1* par ARN interférant dans des cellules rénales murines (IMCD3) (Li et al., 2007a) ou des cellules rétiniennes humaines (hTERT-RPE1) (Graser et al., 2007a) provoque la formation de cils anormalement courts et non-fonctionnels. Dans ces cellules, la ciliogenèse est restaurée grâce à l'expression de la partie N-terminale d'ALMS1 (équivalent à 40% de séquence totale) (Li et al., 2007a). Ces résultats suggèrent donc que l'absence totale de la protéine ALMS1 induit des défauts majeurs de l'assemblage du cil qui ne s'observent pas dans les cellules mutées pour *ALMS1* en raison de la production d'une forme tronquée de la protéine assurant certains de ses rôles. La présence d'une protéine ALMS1 tronquée garantirait donc la formation et la fonction du cil, mais ne suffirait pas à assurer son maintien.

3. Les mutations d'ALMS1 et CDK5RAP2 induisent des altérations centrosomales distinctes.

Les mutations d'*ALMS1* et de *CDK5RAP2* ont toutes les deux pour effet de diminuer le marquage centrosomal de CNAP1. Cette protéine localisée à l'extrémité proximale des centrioles permet l'ancrage de ROOTLETINE, la protéine formant le pont entre les centrioles (Bahe et al., 2005). La déplétion de CNAP1 ou de ROOTLETINE dans des cellules humaines perturbe la cohésion du centrosome et induit un éloignement anormal des centrioles (Bahe et al. 2005; Mayor et al. 2000). Au vu des données disponibles dans la littérature, comment expliquer que la réduction de CNAP1 dans les cellules mutées pour *CDK5RAP2* ne s'accompagne pas d'une augmentation de la distance entre les centrioles, contrairement à ce qui est observé dans les cellules ALMS1 ? Cette divergence du phénotype centrosomal pourrait s'expliquer par les localisations et fonctions distinctes de ces deux protéines.

La protéine ALMS1 est présente à l'extrémité proximale des centrioles. Sa déplétion par petits ARN interférents dans des cellules humaines U2OS et HEK293 réduit l'ancrage de CNAP1 et affaiblit le lien ROOTLETINE entre les centrioles (Knorz et al., 2010), ce qui augmente la distance intercentriolaires (Figure 37). Nous n'avons pas constaté de réduction du signal centrosomal de ROOTLETINE après immunomarquages des cellules mutées pour *ALMS1*. Il serait intéressant de réaliser des expériences plus quantitatives, telles que des Western blots, afin de vérifier les niveaux de ROOTLETINE. Alternativement, il est possible que le taux global de ROOTLETINE ne soit pas affecté par la perte d'ALMS1, mais que sa structure soit désorganisée ou allongée (figure 37). Cette hypothèse pourrait être vérifiée grâce à de l'imagerie confocale à haute résolution. Soulignons que l'invalidation de Rootletine chez la souris affecte le maintien à long terme de certains cils tel que le cil spécialisé des photorécepteurs (Yang et al., 2005). De même, la mutation de *CNAP1* est associée chez l'Homme à une forme de surdité neurosensorielle accompagnée d'une dystrophie des cônes de la rétine (Kubota et al., 2018) ainsi qu'au syndrome Usher provoquant, entre autres, une surdité neurosensorielle et une rétinite pigmentaire (Fuster-García et al., 2018). Les patients atteints du syndrome d'Alström souffrent également de dystrophie des cônes de la rétine aboutissant à la perte de la vue peu de temps après la naissance. Il n'est donc pas exclu qu'un défaut du lien intercentriolaire soit à l'origine des défauts sensoriels observés lorsqu'*ALMS1* est muté.

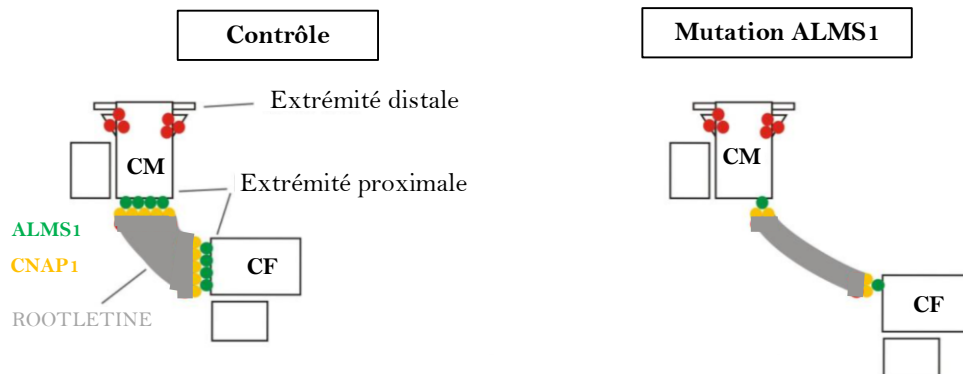


Figure 37 : Représentation schématique du défaut centriolaire observé dans les cellules mutées pour ALMS1. La protéine ALMS1 est localisée à l'extrémité des centrioles et semble recruter CNAP1. CNAP1 sert alors d'ancrage à ROOTLETINE qui sert de pont protéique entre les deux centrioles. Dans les cellules mutées pour ALMS1, le marquage pour CNAP1 est plus faible et la distance entre les centrioles est accrue, ce qui laisse supposer une diminution de la cohésion centriolaire. CM= centriole mère ; CF= centriole fille. Illustration adaptée de Hearn 2018.

La protéine CDK5RAP2 est quant à elle une protéine du matériel péricentriolaire qui n'est pas connue pour interagir avec CNAP1. Il est possible que la diminution du signal CNAP1 observée par immunomarquage dans les cellules mutées pour CDK5RAP2 résulte d'un problème de recrutement au centrosome, ou encore que CDK5RAP2 module sa stabilité ou influence son interaction avec certains partenaires protéiques. Il n'est pas exclu que l'action de CDK5RAP2 sur la localisation centrosomale de CNAP1 soit indirecte. En effet, CDK5RAP2 interagit notamment avec la péricentrine (Graser et al., 2007b; Kim and Rhee, 2014), une protéine qui sert de plateforme d'ancrage à de nombreuses autres protéines (Delaval and Doxsey, 2010). Nous souhaiterions donc effectuer des immunomarquages dirigés contre la péricentrine et réaliser une étude plus approfondie de la morphologie du centrosome et du lien intercentriolaire par microscopie confocale à haute résolution dans les cellules mutées pour CDK5RAP2. Les fibroblastes CDK5RAP2 contiennent également des niveaux de γ -TUBULINE réduits. Il a été montré qu'une quantité minimale de γ -TUBULINE était nécessaire pour la survie des cellules. En effet, en dessous d'un seuil critique avoisinant les 50%, les cellules s'arrêtent en interphase du cycle cellulaire avant d'entrer en apoptose (Rosselló et al., 2018). Cependant, ce seuil ne semble pas être atteint suite à la mutation de *CDK5RAP2* puisque nous n'avons pas observé de mort accrue dans les fibroblastes mutés. Notons que γ -TUBULINE intervient également dans la formation de fibres appelées des γ -tubules (Lindström and Alvarado-Kristensson, 2018). Les rôles de ces structures composées de γ -TuRC et de PERICENTRINE ne sont pas encore clairement définis, mais elles pourraient aider à maintenir la forme et la position de certaines organelles comme l'appareil de Golgi et les mitochondries (Rosselló et al., 2018). Les γ -tubules étant principalement observés dans les cellules qui ne sont pas en division, il serait intéressant d'étudier leur rôle éventuel dans les CCs qui sont, rappelons-le, des cellules post-mitotiques. Dans un premier temps, la présence de ces γ -tubules pourraient être mis en évidence par immunomarquages spécifiques de γ -TUBULINE et de PERICENTRINE suivis d'une analyse par microscopie confocale à haute résolution. Si de telles structures sont observées dans les CCs, nous pourrions étudier l'impact de leur déstabilisation en exposant les cellules à une baisse de température induisant la dépolymérisation des γ -tubules (Rosselló et al., 2018). Cela nous permettrait également d'étudier la capacité des γ -tubules à se reformer et l'impact de la mutation de CDK5RAP2 sur la dynamique de ces structures. Une diminution des niveaux de γ -TUBULINE pourrait donc affecter les cellules ciliées par le truchement des γ -tubules.

Finalement, soulignons que le centrosome n'est pas le seul centre organisateur des microtubules au sein de la cellule. *In vivo*, la nucléation des microtubules via les γ TuRCs a été décrite au niveau de l'appareil de Golgi, de l'enveloppe nucléaire, de la membrane plasmique ou encore à partir de microtubules déjà polymérisés (Petry and Vale, 2015). De plus, d'autres protéines que CDK5RAP2

(e.g. PERICENTRINE, AKAP450 et CEP192) sont impliquées dans l'ancrage des complexes γ -TuRCs aux différents centres organisateurs des microtubules. Une étude récente démontre des niveaux variables d'implication de ces protéines dans l'ancrage des γ -TuRCs selon les centres organisateurs concernés. Plus précisément, les résultats suggèrent que CDK5RAP2 ne participe que modestement à la nucléation des microtubules à partir du centrosome alors qu'elle est impliquée dans la nucléation des microtubules prenant naissance à partir de l'appareil de Golgi (Gavilan et al., 2018). Considérées dans leur ensemble, ces informations pourraient expliquer pourquoi les patients porteurs de mutations sur le gène *CDK5RAP2* ne présentent pas de réduction majeure de la capacité des cellules à proliférer. En effet, la microcéphalie développée par les patients n'est pas imputée à une absence de division cellulaire mais à un déséquilibre entre les divisions symétriques et asymétriques des progéniteurs neuronaux (Lancaster et al., 2013; Lizarraga et al., 2010b). Ces derniers se divisent, mais suivant un axe qui favorise l'obtention d'une cellule progénitrice et d'un neurone plutôt que deux cellules progénitrices. CDK5RAP2 n'est donc pas indispensable à la division cellulaire en tant que telle, mais pourrait influencer l'orientation de l'axe de division. Nous avons d'ailleurs remarqué à plusieurs reprises une cassure dans l'orientation de la plaque mitotique des hiPSCs CDK5RAP2 (Figure 22 A ; chapitre Résultats). La réduction du nombre de cellules BrdU+ et Ki67+ que nous avons observée dans ces cellules pourrait également s'expliquer par des défauts du plan de division cellulaire puisque certaines des cellules filles obtenues après cytokinèse anormale ne conserveraient pas la capacité de proliférer.

Au vu de l'ensemble de ces observations et des données disponibles dans la littérature, il nous paraît indispensable de poursuivre la caractérisation de nos cellules par l'étude de leur cytosquelette. Des immunomarquages dirigés contre des protéines enrichies dans les microtubules stables (e.g. α - et β -TUBULINE) et analysés par microscopie confocale à haute résolution permettront d'évaluer l'intégrité du réseau de microtubules, ses origines centrosomales ou acentrosomales, la qualité et l'orientation des fuseaux mitotiques ainsi que la capacité des microtubules à se reformer après une dépolymérisation induite par le nocodazole. Ces marquages permettraient également d'investiguer l'intégrité de la structure ciliaire, également composée de microtubules, dans les cellules en interphase. Le centrosome ayant récemment été associé au réseau d'actine (Farina et al., 2016), l'intégrité de ce dernier sera également évaluée par immunomarquages. L'analyse des coupes d'organoïdes marquées à la phalloïdine couplée à un fluorochrome n'ont pas mis en évidence de défaut majeur du réseau d'actine. Toutefois, un défaut très ciblé d'une sous-population de filaments d'actine localisés à la jonction entre les stéréocils et la plaque cuticulaire des CCs peut être à l'origine d'une surdité progressive (Haag et al., 2018). Nous réaliserons donc une étude poussée du réseau d'actine par microscopie confocale à haute résolution.

4. La mutation de *CDK5RAP2* semble abolir la formation de cellules ciliées matures dans notre modèle d'étude.

Au cours de notre travail, nous avons montré que la mutation de *CDK5RAP2* n'empêche pas la formation de progéniteurs otiques. Pourtant, nos organoïdes cessent de croître peu après la fin de la phase d'induction otique et contiennent peu de cellules ciliées (POU4F3+ mais pas MYO7A+) au terme de leur maturation. L'hypothèse selon laquelle cette réduction de taille est le résultat d'un défaut majeur de la prolifération cellulaire est peu probable. En effet, comme nous l'avons évoqué plus haut, les patients ne présentent pas de défaut majeur de prolifération et la microcéphalie s'explique par un changement du type de division engagé par les progéniteurs neuronaux, mais pas par une incapacité à se diviser. De même, le patient *CDK5RAP2* considéré dans ce projet ne souffre pas de surdité congénitale mais périnatale. Le développement *in vitro* d'un épithélium comportant des cellules ciliées fonctionnelles ne devrait donc pas être affecté par la mutation du gène. Dès lors, comment expliquer ces observations ? Sont-elles dues à une mort cellulaire accrue, comme celle observée par Kraemer et al. dans les cellules neuronales progénitrices et post-mitotiques précoces dérivées de mESCs déplétées pour *CDK5RAP2* (Kraemer et al., 2015) ? Se peut-il qu'une sous-population sécrétant des facteurs requis pour la différenciation des progéniteurs en cellules ciliées soit sensible à la mutation de *CDK5RAP2*, et qu'au cours du développement embryonnaire d'autres types cellulaires d'origine non-ectodermiques suppléent ce manque ? En effet, l'oreille interne en développement est colonisée par certaines cellules dérivées de la crête neurale qui donneront naissance à des cellules de la strie vasculaire et à certaines cellules du ganglion spiral (Sandell et al., 2014). Ces cellules ne peuvent être présentes dans les organoïdes au vu du protocole suivi pour l'établissement de notre modèle. Pour répondre à ces questions, nous souhaiterions poursuivre nos investigations sur les organoïdes *CDK5RAP2*. Notamment, nous aimerions les cultiver dès le jour 18 de différenciation dans du milieu conditionné provenant de cultures d'organoïdes WT ou *ALMS1*, afin de vérifier si cela permet une croissance normale des organoïdes et favorise la différenciation en cellules ciliées. D'autre part, nous avons constaté une différence de densité cellulaire au sein des organoïdes mutés pour *CDK5RAP2*, puisqu'elles semblent plus compactes que celles présentes dans les organoïdes WT ou *ALMS1*. Il serait intéressant de confirmer (ou infirmer) cette observation en comptant le nombre total de cellule rapporté sur le volume de l'organoïde considéré. Pour ce faire, il est primordial d'établir un protocole d'immunomarquages et d'imagerie 3D sur les organoïdes tardifs qui, de par leur taille et leur densité importante, sont relativement réfractaires à la pénétration des anticorps. La priorité sera d'évaluer si les données récoltées sont imputables à la mutation du gène *CDK5RAP2* ou à un biais technique.

5. La mutation d'ALMS1 n'altère pas la capacité à générer des cellules ciliées.

Notre travail démontre que la mutation du gène ALMS1 n'altère pas la formation des cellules ciliées. Ces résultats *in vitro* sont en accord avec la pathologie humaine pour laquelle les patients développent une surdité neurosensorielle bilatérale progressive vers l'âge de 7 ans, et qui s'aggrave de 10 à 15dB par décennie (Lindsey et al., 2017). Le suivi de 33 patients a souligné l'absence d'otoémissions acoustiques, ce qui suggère une lésion des cellules ciliées externes (Lindsey et al., 2017). La perte progressive de ces dernières a d'ailleurs été mise en évidence dans les souris *Alms1^{-/-}* (Jagger et al., 2011). Notons tout de même que la surdité commence à se développer chez des souris âgées de 7 mois alors que la surdité apparaît dans l'enfance chez l'Homme, soulignant les limitations de la modélisation des pathologies humaines grâce aux animaux et appuyant l'importance de développer des modèles humains. L'analyse post-mortem des cochlées de deux patients révèle également une dégénérescence massive de l'organe de Corti (Nadol Jr et al., 2015). Ces données suggèrent donc que la mutation d'ALMS1 affecte la maintenance des structures otiques plutôt que leur développement.

Si la mutation d'ALMS1 n'empêche pas le développement de cellules ciliées, comment expliquer la surdité des patients ? Très récemment, une augmentation de la distance intercentriolaire similaire à celle observée en l'absence d'ALMS1 a été démontrée dans les cellules sensorielles de souris invalidées pour le gène *Cobl*, impliqué dans la nucléation des fibres d'actines (Haag et al., 2018). Les souris âgées de 12 à 14 semaines ont des potentiels évoqués auditifs normaux mais des otoémissions acoustiques anormales, ce qui reflète des anomalies au niveau des cellules ciliées externes impliquées dans l'amplification du signal sonore (Haag et al., 2018). Chez ces souris, le réseau d'actine est perturbé très localement puisque la densité des fibres présentes sous la surface apicale des cellules est réduite. Normalement, la surface apicale des cellules sensorielles est couverte d'un réseau extrêmement dense d'actine qui forme la plaque cuticulaire, au sein de laquelle se trouvent le corps basal du cil ainsi que les pieds d'ancrage de la touffe stéréociliaire. Cette observation est particulièrement intéressante puisqu'il a été suggéré que le centrosome n'est pas seulement un centre organisateur de microtubules, mais qu'il serait également à l'origine de la polymérisation des fibres d'actine (Farina et al., 2016). Ainsi, la perte de *Cobl* chez les souris diminuerait la capacité du centrosome à développer un réseau complet d'actine sous l'organelle mécanosensoriel, ce qui pourrait entraver son fonctionnement ou sa résistance au stress mécanique lié aux vibrations induites par l'onde sonore. De plus, la structure, la polarisation et la fonctionnalité du réseau d'actine décline avec l'âge. Chez la levure, lorsque la dynamique de l'actine est ralentie, elle s'agrège dans le cytoplasme, détériore les membranes mitochondriales, ce qui mène à l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène et, secondairement, à la mort de la cellule (Amberg et al., 2011; Gourlay et al., 2004). Un lien entre ALMS1

et l'actine a déjà été mis en évidence puisque la protéine Alms1 interagit avec l'actinine- α (Collin et al., 2012), une protéine impliquée dans la formation de ponts entre les filaments et interagissant avec de nombreuses protéines du cytosquelette ainsi que leurs régulateurs (Sjöblom et al., 2008). Cette protéine régulatrice du maillage d'actine est ainsi exprimée dans la plaque cuticulaire ainsi que les stéréocils présents à la surface des cellules ciliées (Zine and Romand, 1993). Des problèmes dans le réseau d'actine pourraient favoriser le vieillissement précoce des CCEs et entraîner leur dégénérescence. Il a d'ailleurs été démontré très récemment que les souris invalidées pour *Lmo7* développent une surdité progressive tardive suite à des défauts du réseau d'actine de la plaque cuticulaire (Du et al., 2019). Nos futures investigations s'orienteront donc également vers l'observation du réseau d'actine, notamment sous la surface apicale des CCs obtenues après différenciation des hiPSCs mutées pour *ALMS1*.

Soulignons qu'une altération du réseau d'actine pourrait également être à l'origine des surdités liées à la mutation de *CDK5RAP2*. En effet, la protéine *CDK5* phosphoryle de nombreuses protéines impliquées dans l'assemblage et la maintenance des filaments d'actine. Son invalidation dans les cellules ciliées mène à une désorganisation progressive des touffes stéréociliaires ainsi qu'à la dégénérescence des cellules ciliées externes chez des souris *CDK5^{-/-}* âgées de 2 mois (Zhai et al., 2018). La protéine *CDK5RAP2* interagissant avec *CDK5R1*, un activateur de *CDK5*, il est possible que sa mutation ait pour conséquence une modification du réseau d'actine entraînant une dégénérescence des cellules ciliées externes et, secondairement, le développement d'une surdité progressive précoce.

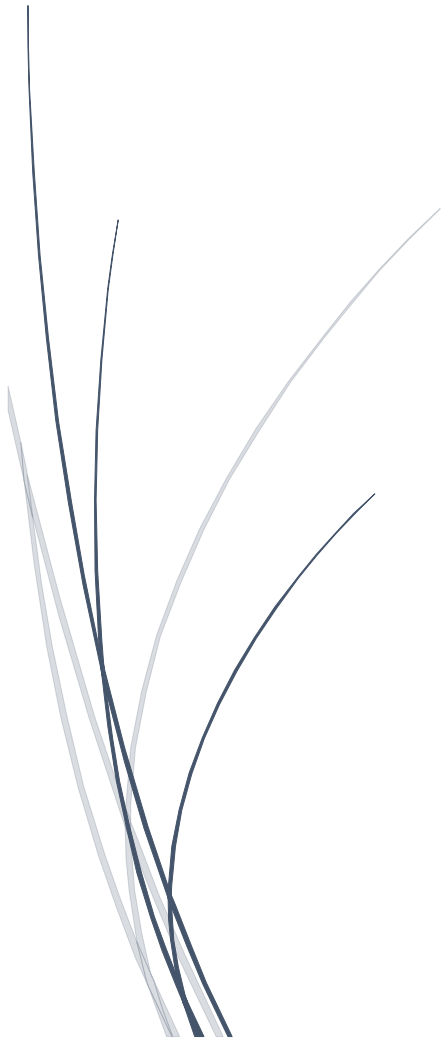
6. Quelle est la pertinence de l'utilisation des hiPSCs pour l'établissement d'un modèle d'étude des surdités dégénératives ?

Les mutations que nous avons étudiées au laboratoire provoquent une surdité progressive déclarée dès l'enfance. De nombreuses anomalies génétiques résultent ainsi en une dégénérescence de la fonction auditive. Le modèle que nous avons appliqué au laboratoire peut être utilisé en première instance comme un modèle d'étude des surdités développementales. Cependant, maintenir la culture des organoïdes à très long terme permettrait également d'évaluer la dégénérescence des cellules ciliées. Pour cela, le développement et l'utilisation de nouvelles technologies sont essentiels. L'utilisation d'un bioréacteur nouvellement commercialisé nous a permis de réduire de moitié le temps nécessaire à la formation des cellules ciliées et donc laisse entrevoir la possibilité de culture des organoïdes à très long terme. Néanmoins, si la surdité chez l'Homme n'apparaît qu'après plusieurs années de vie, doit-on envisager des cultures aussi longues pour espérer modéliser la dégénérescence des cellules ciliées ? Il est possible de soumettre les cellules à un stress qui accélérerait le processus dégénératif et permettrait

l'identification des mécanismes sous-jacents. Récemment, de telles expériences réalisées dans des cultures de cellules cochléaires dérivées de patients atteints du syndrome de Pendred ont permis de démontrer que la pathologie était de type dégénératif et résultait de la formation d'agrégats cytoplasmiques et non d'une dysfonction de canaux ioniques, comme initialement supposé (Hosoya et al., 2017). A partir de cultures obtenues à si long terme, quelles analyses peut-on réaliser en fin de parcours sur un matériel aussi précieux ? L'identification des mécanismes aboutissant à la dégénérescence des cellules ciliées nécessiterait une purification des cellules ciliées à partir des organoïdes, ce qui n'est actuellement pas réalisable. Nous pourrions créer des lignées exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de gènes spécifiquement exprimés dans les cellules ciliées tels que *MYOSINE7A*, ce qui nous permettrait d'isoler par FACS les cellules GFP+. Cela nécessiterait bien sûr quelques mises au point afin de réussir à dissocier les organoïdes sans altérer nos cellules d'intérêt.

L'utilisation et la différenciation des cellules souches humaines pour la modélisation des surdités génétiques est donc une perspective attrayante et prometteuse. Bien que certains ajustements et mises au point soient encore à faire, ce modèle présente l'avantage majeur d'être humain. Nos résultats actuels (et futurs) ne sont donc pas soumis au risque d'une variabilité inter-espèce les rendant caducs, comme cela peut être cas lors de l'utilisation de modèle murins.

Conclusion



Conclusion

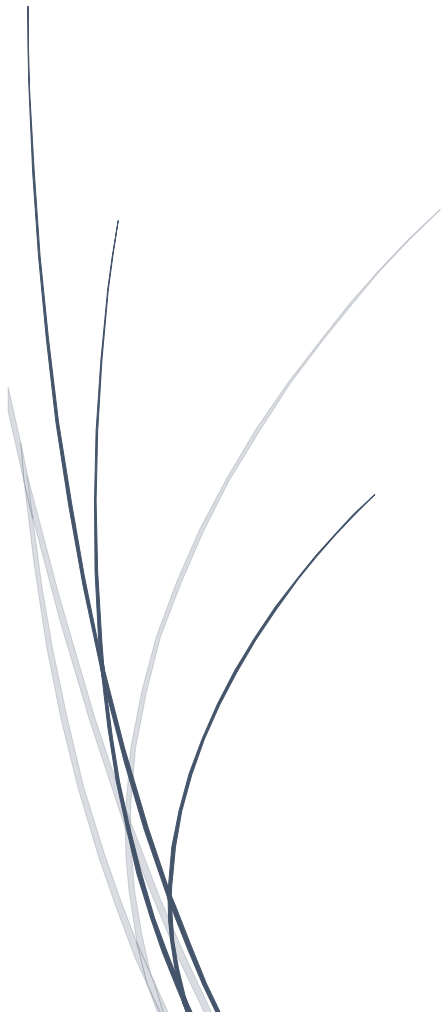
A ce jour, plus de la moitié des cas de surdité ont une origine génétique (Angeli et al., 2012). Au cours de ce travail, nous nous sommes spécifiquement intéressés à l'étude de deux gènes codant pour des protéines centrosomales et dont les mutations induisent des pathologies se traduisant, notamment, par le développement d'une surdité neurosensorielle bilatérale. Ainsi, la mutation du gène *ALMS1* est responsable du syndrome d'Alström et provoque l'apparition de plusieurs symptômes d'intensité variables parmi lesquels une dégénérescence des cônes rétiniens, une obésité, un diabète de type II, des déficiences rénales et hépatiques en plus de la surdité. La mutation du gène *CDK5RAP2* est quant à elle à l'origine d'une microcéphalie de type MCPH associée à certains cas de surdité. Dans le but de comprendre les mécanismes liés au développement de la surdité chez ces patients, nous avons utilisé un modèle d'étude humain reposant sur la différenciation des hiPSCs en cellules ciliées de l'oreille interne.

Dans un premier temps, nous avons généré au laboratoire des lignées de hiPSCs à partir de fibroblastes de patients porteur de mutations sur les gènes *ALMS1* et *CDK5RAP2* ainsi qu'à partir de donneurs sains (WT). L'utilisation de protocoles de différenciation 2D et 3D des hiPSCs nous a permis de démontrer que ces mutations n'altèrent pas la formation de progéniteurs otiques. Par contre, nous n'avons jamais observé de cellules ciliées matures dans les organoïdes *CDK5RAP2*. Ces résultats sont étonnants puisque le patient étudié n'a développé une surdité qu'au cours de la petite enfance, suggérant qu'un mécanisme compensatoire est présent au cours du développement embryonnaire de l'oreille interne. L'étude des cellules mutées pour *CDK5RAP2* a permis de mettre en évidence une réduction des protéines CNAP1 et γ -TUBULINE. De façon intéressante, la réduction de γ -TUBULINE n'est pas suffisante pour provoquer l'arrêt de la prolifération et induire l'entrée en apoptose des cellules. Néanmoins, l'observation fréquente de cassures dans la plaque équatoriale des cellules en phase M semble indiquer un défaut de l'axe de division, ce qui pourrait expliquer la diminution de cellules Ki67+ et BrdU+ lorsque *CDK5RAP2* est mutée. Ces résultats, couplés à ceux disponibles dans la littérature, suggèrent que *CDK5RAP2* joue un rôle dans le maintien d'un axe de division cellulaire correct. En présence d'une mutation pour *ALMS1*, nous avons également observé une diminution d'expression de CNAP1 suite à un immunomarquage. Le phénotype s'accompagnait d'une augmentation de la distance intercentriolaire reflétant un affaiblissement de la cohésion entre les centrioles. Ces résultats s'accordent avec ceux précédemment décrits, et appuient le rôle d'*ALMS1* comme protéine d'ancrage de CNAP1. La formation de nombreuses cellules ciliées à partir des hiPSCs *ALMS1* et l'apparition progressive de la surdité au cours de l'enfance chez les patients souffrant du

syndrome d'Alström suggèrent que la protéine ALMS1 intervient dans le maintien des cellules ciliées plutôt que dans leur développement. Dans la littérature, la mutation d'*ALMS1* a été associée à une perturbation de la sortie du cycle cellulaire des cardiomyocytes, qui prolifèrent anormalement après la naissance, ce qui explique le développement d'une cardiomyopathie dilatée chez les patients atteints du syndrome d'Alström (Shenje et al., 2014). Considérées dans leurs ensembles, ces données appuient des fonctions différentes de la protéine ALMS1 selon le type cellulaire considéré, et apportent un élément de réponse quant à la multitude de symptômes présents chez ces patients.

Des analyses supplémentaires sont nécessaires afin de comprendre les mécanismes aboutissant au développement des surdités chez les patients porteurs de mutations des gènes *ALMS1* et *CDK5RAP2*. Notamment, une étude poussée du cytosquelette cellulaire est nécessaire. Le centrosome apparaît comme essentiel au maintien des CCs. Le développement de nouvelles technologies laisse entrevoir la culture à très long terme des organoïdes et, par là-même, la possibilité d'étudier la maintenance des CCs mais également celle des neurones qui les connectent et des cellules de soutien qui les entourent.

Bibliographie



Bibliographie

- Abboud, N., Fontbonne, A., Watabe, I., Tonetto, A., Brezun, J. M., Feron, F., et al. (2016). Culture conditions have an impact on the maturation of traceable, transplantable mouse embryonic stem cell-derived otic progenitor cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* doi:10.1002/term.2163.
- Ahmed, M., Wong, E. Y. M., Sun, J., Xu, J., Wang, F., and Xu, P.-X. (2012). Eya1-Six1 Interaction Is Sufficient to Induce Hair Cell Fate in the Cochlea by Activating Atoh1 Expression in Cooperation with Sox2. *Dev. Cell* 22, 377–390. doi:10.1016/j.devcel.2011.12.006.
- Alderton, G. K., Galbiati, L., Griffith, E., Surinya, K. H., Neitzel, H., Jackson, A. P., et al. (2006). Regulation of mitotic entry by microcephalin and its overlap with ATR signalling. *Nat. Cell Biol.* 8, 725–733. doi:10.1038/ncb1431.
- ALSTROM, C. H., HALLGREN, B., NILSSON, L. B., and ASANDER, H. (1959). Retinal degeneration combined with obesity, diabetes mellitus and neurogenous deafness: a specific syndrome (not hitherto described) distinct from the Laurence-Moon-Bardet-Biedl syndrome: a clinical, endocrinological and genetic examination based on a large pedigree. *Acta Psychiatr. Neurol. Scand. Suppl.* 129, 1–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13649370> [Accessed February 19, 2019].
- Amberg, D., Leadsham, J. E., Kotiadis, V., and Gourlay, C. W. (2011). “Cellular Ageing and the Actin Cytoskeleton,” in 331–352. doi:10.1007/978-94-007-2561-4_15.
- Amit, M., Shariki, C., Margulets, V., and Itskovitz-Eldor, J. (2004). Feeder Layer- and Serum-Free Culture of Human Embryonic Stem Cells1. *Biol. Reprod.* 70, 837–845. doi:10.1095/biolreprod.103.021147.
- Angeli, S., Lin, X., and Liu, X. Z. (2012). Genetics of hearing and deafness. *Anat. Rec. (Hoboken)*. 295, 1812–29. doi:10.1002/ar.22579.
- Apostolou, E., and Stadtfeld, M. (2018). Cellular trajectories and molecular mechanisms of iPSC reprogramming. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 52, 77–85. doi:10.1016/j.gde.2018.06.002.
- Appler, J. M., and Goodrich, L. V (2011). Connecting the ear to the brain: Molecular mechanisms of auditory circuit assembly. *Prog. Neurobiol.* 93, 488–508. doi:10.1016/j.pneurobio.2011.01.004.
- Arnold, K., Sarkar, A., Yram, M. A., Polo, J. M., Bronson, R., Sengupta, S., et al. (2011). Sox2(+) adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice. *Cell Stem Cell* 9, 317–29. doi:10.1016/j.stem.2011.09.001.
- Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 17, 126–40. doi:10.1101/gad.224503.
- Azim Surani, M. (2014). Genomic Reprogramming. *Essentials Stem Cell Biol.*, 453–463. doi:10.1016/B978-0-12-409503-8.00031-7.
- Bahe, S., Stierhof, Y.-D., Wilkinson, C. J., Leiss, F., and Nigg, E. A. (2005). Rootletin forms centriole-associated filaments and functions in centrosome cohesion. *J. Cell Biol.* 171, 27–33. doi:10.1083/jcb.200504107.
- Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C. J., Mclauchlan, H., et al. (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem. J.* 408, 297–315. doi:10.1042/BJ20070797.
- Baker, K., and Beales, P. L. (2009). Making sense of cilia in disease: The human ciliopathies. *Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet.* 151C, 281–295. doi:10.1002/ajmg.c.30231.
- Banito, A., Rashid, S. T., Acosta, J. C., Li, S., Pereira, C. F., Geti, I., et al. (2009). Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Dev.* 23, 2134–9. doi:10.1101/gad.1811609.

- Barrera, J. A., Kao, L.-R., Hammer, R. E., Seemann, J., Fuchs, J. L., and Megraw, T. L. (2010). CDK5RAP2 regulates centriole engagement and cohesion in mice. *Dev. Cell* 18, 913–26. doi:10.1016/j.devcel.2010.05.017.
- Basch, M. L., Brown, R. M., Jen, H. I., and Groves, A. K. (2016). Where hearing starts: The development of the mammalian cochlea. *J. Anat.* 228, 233–254. doi:10.1111/joa.12314.
- Bendall, S. C., Stewart, M. H., Menendez, P., George, D., Vijayaragavan, K., Werbowetski-Ogilvie, T., et al. (2007). IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro. *Nature* 448, 1015–1021. doi:10.1038/nature06027.
- Beneden, É. Van (1887). Nouvelles recherches sur la fécondation et la division mitotique chez l'Ascaride mégalocéphale.
- Bettencourt-Dias, M., and Glover, D. M. (2007). Centrosome biogenesis and function: centrosomes brings new understanding. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 451–463. doi:10.1038/nrm2180.
- Bibas, A., Hornigold, R., Liang, J., Michaels, L., Anagnostopoulou, S., and Wright, A. (2006). The development of the spiral ganglion in the human foetus. *Folia Morphol. (Warsz)*. 65, 140–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16773603> [Accessed October 24, 2018].
- Bond, J., Roberts, E., Springell, K., Lizarraga, S., Scott, S., Higgins, J., et al. (2005). A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size. *Nat. Genet.* 37, 353–355. doi:10.1038/ng1539.
- Boroviak, T., Loos, R., Lombard, P., Okahara, J., Behr, R., Sasaki, E., et al. (2015). Lineage-Specific Profiling Delineates the Emergence and Progression of Naive Pluripotency in Mammalian Embryogenesis. *Dev. Cell* 35, 366–382. doi:10.1016/j.devcel.2015.10.011.
- Boutin, C., Labedan, P., Dimidschstein, J., Richard, F., Cremer, H., Andre, P., et al. (2014). A dual role for planar cell polarity genes in ciliated cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E3129–E3138. doi:10.1073/pnas.1404988111.
- Boveri, T. (1887). Ueber den Antheil des Spermatozoon an der Theilung des Eies. Available at: https://scholar.google.com/scholar_lookup?journal=Sitzungsber.+Ges.+Morph.+Physiol.+München&title=Ueber+den+Antheil+des+Spermatozoon+an+der+Teilung+des+Eies&author=T+Boveri&volume=3&publication_year=1887&pages=151-164&#d=gs_cit&u=%2Fscholar%3Fq%3Dinfo%3ARTKM3gD3aTUJ%3Ascholar.google.com%2F%26output%3Dcite%26scirp%3D0%26hl%3Dfr [Accessed June 24, 2019].
- Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., et al. (2005). Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell* 122, 947–956. doi:10.1016/j.cell.2005.08.020.
- Bricaud, O., Leslie, A. C., and Gonda, S. (2006). Development/Plasticity/Repair The Transcription Factor six1 Inhibits Neuronal and Promotes Hair Cell Fate in the Developing Zebrafish (Danio rerio) Inner Ear. doi:10.1523/JNEUROSCI.1025-06.2006.
- Brigande, J. V., and Heller, S. (2009). Quo vadis, hair cell regeneration? *Nat. Neurosci.* 12, 679–85. doi:10.1038/nn.2311.
- Brons, I. G. M., Smithers, L. E., Trotter, M. W. B., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S. M., et al. (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448, 191–195. doi:10.1038/nature05950.
- Brosh, R., Assia-Alroy, Y., Molchadsky, A., Bornstein, C., Dekel, E., Madar, S., et al. (2013). p53 Counteracts reprogramming by inhibiting mesenchymal-to-epithelial transition. *Cell Death Differ.* 20, 312–320. doi:10.1038/cdd.2012.125.
- C. R. Cederroth J.-D. Vassalli S. Nef (2007). De l'épigénétique et du développement. *Re Med Suisse* 3. Available at: <https://www.revmed.ch/RMS/2007/RMS-100/32085> [Accessed October 25, 2018].
- Carvalho-Santos, Z., Machado, P., Branco, P., Tavares-Cadete, F., Rodrigues-Martins, A., Pereira-Leal, J. B., et al. (2010). Stepwise evolution of the centriole-assembly pathway. *J. Cell Sci.* 123, 1414–

26. doi:10.1242/jcs.064931.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., et al. (2003). Functional Expression Cloning of Nanog, a Pluripotency Sustaining Factor in Embryonic Stem Cells. *Cell* 113, 643–655. doi:10.1016/S0092-8674(03)00392-1.
- Chen, J.-H., Geberhiwot, T., Barrett, T. G., Paisey, R., and Semple, R. K. (2017). Refining genotype-phenotype correlation in Alström syndrome through study of primary human fibroblasts. *Mol. Genet. genomic Med.* 5, 390–404. doi:10.1002/mgg3.296.
- Chen, J.-R., Tang, Z.-H., Zheng, J., Shi, H.-S., Ding, J., Qian, X.-D., et al. (2016). Effects of genetic correction on the differentiation of hair cell-like cells from iPSCs with MYO15A mutation. *Cell Death Differ.* 23, 1347–57. doi:10.1038/cdd.2016.16.
- Chen, J., and Streit, A. (2013). Induction of the inner ear: stepwise specification of otic fate from multipotent progenitors. *Hear. Res.* 297, 3–12. doi:10.1016/j.heares.2012.11.018.
- Chen, W., Jongkamonwiwat, N., Abbas, L., Eshtan, S. J., Johnson, S. L., Kuhn, S., et al. (2012). Restoration of auditory evoked responses by human ES-cell-derived otic progenitors. *Nature* 490, 278–282. doi:10.1038/nature11415.
- Ching, Y. P., Qi, Z., and Wang, J. H. (2000). Cloning of three novel neuronal Cdk5 activator binding proteins. *Gene* 242, 285–294. doi:10.1016/S0378-1119(99)00499-0.
- Choi, J., Huebner, J., Clement, K., Walsh, R. M., Savol, A., Lin, K., et al. (2017). Prolonged Mek1/2 suppression impairs the developmental potential of embryonic stem cells. doi:10.1038/nature23274.
- Choi, Y. K., Liu, P., Sze, S. K., Dai, C., and Qi, R. Z. (2010). CDK5RAP2 stimulates microtubule nucleation by the γ -tubulin ring complex. *J. Cell Biol.* 191, 1089–1095. doi:10.1083/jcb.201007030.
- Chronis, C., Fiziev, P., Papp, B., Butz, S., Bonora, G., Sabri, S., et al. (2017). Cooperative Binding of Transcription Factors Orchestrates Reprogramming. *Cell* 168, 442–459.e20. doi:10.1016/J.CELL.2016.12.016.
- Clevers, H. (2006). Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* 127, 469–480. doi:10.1016/J.CELL.2006.10.018.
- Coelho, P. A., Bury, L., Shahbazi, M. N., Liakath-Ali, K., Tate, P. H., Wormald, S., et al. (2015). Over-expression of Plk4 induces centrosome amplification, loss of primary cilia and associated tissue hyperplasia in the mouse. *Open Biol.* 5, 150209. doi:10.1098/rsob.150209.
- Collin, G. B., Cyr, E., Bronson, R., Marshall, J. D., Gifford, E. J., Hicks, W., et al. (2005). Alms1-disrupted mice recapitulate human Alström syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2323–33. doi:10.1093/hmg/ddi235.
- Collin, G. B., Marshall, J. D., Ikeda, A., So, W. V., Russell-Eggitt, I., Maffei, P., et al. (2002). Mutations in ALMS1 cause obesity, type 2 diabetes and neurosensory degeneration in Alström syndrome. *Nat. Genet.* 31, 74–8. doi:10.1038/ng867.
- Collin, G. B., Marshall, J. D., King, B. L., Milan, G., Maffei, P., Jagger, D. J., et al. (2012). The Alström Syndrome Protein, ALMS1, Interacts with α -Actinin and Components of the Endosome Recycling Pathway. *PLoS One* 7, e37925. doi:10.1371/journal.pone.0037925.
- Conacci-Sorrell, M., McFerrin, L., and Eisenman, R. N. (2014). An overview of MYC and its interactome. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4, a014357. doi:10.1101/cshperspect.a014357.
- Conduit, P. T., Wainman, A., and Raff, J. W. (2015). Centrosome function and assembly in animal cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 611–624. doi:10.1038/nrm4062.
- Connolly, M. B., Jan, J. E., Couch, R. M., Wong, L. T. K., Dimmick, J. E., and Rigg, J. M. (1991). Hepatic dysfunction in Alström disease. *Am. J. Med. Genet.* 40, 421–424. doi:10.1002/ajmg.1320400408.
- Dammermann, A., and Merdes, A. (2002). Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. *J. Cell Biol.* 159, 255–66. doi:10.1083/jcb.200204023.
- Davis, H. (1983). An active process in cochlear mechanics. *Hear. Res.* 9, 79–90. doi:10.1016/0378-

- 5955(83)90136-3.
- Delaval, B., and Doxsey, S. J. (2010). Pericentrin in cellular function and disease. *J. Cell Biol.* 188, 181–90. doi:10.1083/jcb.200908114.
- Ding, J., Tang, Z., Chen, J., Shi, H., Chen, J., Wang, C., et al. (2016). Induction of differentiation of human embryonic stem cells into functional hair-cell-like cells in the absence of stromal cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 81, 208–222. doi:10.1016/j.biocel.2015.11.012.
- Doetzlhofer, A., White, P. M., Johnson, J. E., Segil, N., and Groves, A. K. (2004). In vitro growth and differentiation of mammalian sensory hair cell progenitors: a requirement for EGF and periotic mesenchyme. *Dev. Biol.* 272, 432–447. doi:10.1016/J.YDBIO.2004.05.013.
- Dong, W., and Olson, E. S. (2013). Detection of cochlear amplification and its activation. *Biophys. J.* 105, 1067–78. doi:10.1016/j.bpj.2013.06.049.
- Doxsey, S., McCollum, D., and Theurkauf, W. (2005). CENTROSOMES IN CELLULAR REGULATION. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 411–434. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.122303.120418.
- Du, T.-T., Dewey, J. B., Wagner, E. L., Cui, R., Heo, J., Park, J.-J., et al. (2019). LMO7 deficiency reveals the significance of the cuticular plate for hearing function. *Nat. Commun.* 10, 1117. doi:10.1038/s41467-019-09074-4.
- Dzhindzhev, N. S., Yu, Q. D., Weiskopf, K., Tzolovsky, G., Cunha-Ferreira, I., Riparbelli, M., et al. (2010). Asterless is a scaffold for the onset of centriole assembly. *Nature* 467, 714–718. doi:10.1038/nature09445.
- Ealy, M., Ellwanger, D. C., Kosaric, N., Stapper, A. P., and Heller, S. (2016). Single-cell analysis delineates a trajectory toward the human early otic lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 8508–8513. doi:10.1073/pnas.1605537113.
- Eiraku, M., Takata, N., Ishibashi, H., Kawada, M., Sakakura, E., Okuda, S., et al. (2011). Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* 472, 51–56. doi:10.1038/nature09941.
- Eiraku, M., Watanabe, K., Matsuo-Takasaki, M., Kawada, M., Yonemura, S., Matsumura, M., et al. (2008). Self-Organized Formation of Polarized Cortical Tissues from ESCs and Its Active Manipulation by Extrinsic Signals. *Cell Stem Cell* 3, 519–532. doi:10.1016/J.STEM.2008.09.002.
- Episkopou, V. (2005). SOX2 functions in adult neural stem cells. *Trends Neurosci.* 28, 219–221. doi:10.1016/J.TINS.2005.03.003.
- Esteban, M. A., Wang, T., Qin, B., Yang, J., Qin, D., Cai, J., et al. (2010). Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 71–9. doi:10.1016/j.stem.2009.12.001.
- Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156. doi:10.1038/292154a0.
- Evans, P. D., Vallender, E. J., and Lahn, B. T. (2006). Molecular evolution of the brain size regulator genes CDK5RAP2 and CENPJ. *Gene* 375, 75–79. doi:10.1016/J.GENE.2006.02.019.
- Falk, N., Lösl, M., Schröder, N., and Gießl, A. (2015). Specialized Cilia in Mammalian Sensory Systems. *Cells* 4, 500–19. doi:10.3390/cells4030500.
- Farina, F., Gaillard, J., Guérin, C., Couté, Y., Sillibourne, J., Blanchoin, L., et al. (2016). The centrosome is an actin-organizing centre. *Nat. Cell Biol.* 18, 65–75. doi:10.1038/ncb3285.
- Fekete, D. M., Muthukumar, S., and Karagogeos, D. (1998). Hair cells and supporting cells share a common progenitor in the avian inner ear. *J. Neurosci.* 18, 7811–7821. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9742150> [Accessed August 10, 2017].
- Fish, J. L., Kosodo, Y., Enard, W., Pääbo, S., and Huttner, W. B. (2006). Aspm specifically maintains symmetric proliferative divisions of neuroepithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 10438–10443. doi:10.1073/pnas.0604066103.
- Fong, K.-W., Choi, Y.-K., Rattner, J. B., and Qi, R. Z. (2008). CDK5RAP2 is a pericentriolar protein that

- functions in centrosomal attachment of the gamma-tubulin ring complex. *Mol. Biol. Cell* 19, 115–25. doi:10.1091/mbc.e07-04-0371.
- Freter, S., Muta, Y., Mak, S.-S., Rinkwitz, S., and Ladher, R. K. (2008). Progressive restriction of otic fate: the role of FGF and Wnt in resolving inner ear potential. *Development* 135, 3415–3424. doi:10.1242/dev.026674.
- Freter, S., Muta, Y., O'Neill, P., Vassilev, V. S., Kuraku, S., and Ladher, R. K. (2012). Pax2 modulates proliferation during specification of the otic and epibranchial placodes. *Dev. Dyn.* 241, 1716–1728. doi:10.1002/dvdy.23856.
- Friedman, L. M., Dror, A. A., and Avraham, K. B. (2007). Mouse models to study inner ear development and hereditary hearing loss. *Int. J. Dev. Biol.* 51, 609–631. doi:10.1387/ijdb.0723651f.
- Fritzsich, B., Pan, N., Jahan, I., and Elliott, K. L. (2015). Inner ear development: building a spiral ganglion and an organ of Corti out of unspecified ectoderm. *Cell Tissue Res.* 361, 7–24. doi:10.1007/s00441-014-2031-5.
- Frolenkov, G. I., Belyantseva, I. A., Friedman, T. B., and Griffith, A. J. (2004). Genetic insights into the morphogenesis of inner ear hair cells. *Nat. Rev. Genet.* 5, 489–498. doi:10.1038/nrg1377.
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., and Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 85, 348–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19838014> [Accessed September 29, 2017].
- Fuster-García, C., García-García, G., Jaijo, T., Fornés, N., Ayuso, C., Fernández-Burriel, M., et al. (2018). High-throughput sequencing for the molecular diagnosis of Usher syndrome reveals 42 novel mutations and consolidates CEP250 as Usher-like disease causative. *Sci. Rep.* 8, 17113. doi:10.1038/s41598-018-35085-0.
- Gadue, P., Huber, T. L., Paddison, P. J., and Keller, G. M. (2006). Wnt and TGF-beta signaling are required for the induction of an in vitro model of primitive streak formation using embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 16806–16811. doi:10.1073/pnas.0603916103.
- Gatherer, D., Ten Dijke, P., Baird, D. T., and Akhurst, R. J. (1990). Expression of TGF-beta isoforms during first trimester human embryogenesis. *Development* 110.
- Gavilan, M. P., Gandolfo, P., Balestra, F. R., Arias, F., Bornens, M., and Rios, R. M. (2018). The dual role of the centrosome in organizing the microtubule network in interphase. *EMBO Rep.* 19, e45942. doi:10.15252/embr.201845942.
- Genin, A., Desir, J., Lambert, N., Biervliet, M., Van Der Aa, N., Pierquin, G., et al. (2012). Kinetochore KMN network gene CASC5 mutated in primary microcephaly. *Hum. Mol. Genet.* 21, 5306–5317. doi:10.1093/hmg/ddc386.
- Goetz, S. C., and Anderson, K. V. (2010). The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat. Rev. Genet.* 11, 331–44. doi:10.1038/nrg2774.
- Gönczy, P. (2015). Centrosomes and cancer: revisiting a long-standing relationship. *Nat. Rev. Cancer* 15, 639–652. doi:10.1038/nrc3995.
- Gourlay, C. W., Carpp, L. N., Timpson, P., Winder, S. J., and Ayscough, K. R. (2004). A role for the actin cytoskeleton in cell death and aging in yeast. *J. Cell Biol.* 164, 803–9. doi:10.1083/jcb.200310148.
- Goutman, J. D., Elgoyhen, A. B., and Gómez-Casati, M. E. (2015). Cochlear hair cells: The sound-sensing machines. *FEBS Lett.* 589, 3354–61. doi:10.1016/j.febslet.2015.08.030.
- Graser, S., Stierhof, Y.-D., Lavoie, S. B., Gassner, O. S., Lamla, S., Le Clech, M., et al. (2007a). Cep164, a novel centriole appendage protein required for primary cilium formation. *J. Cell Biol.* 179, 321–330. doi:10.1083/jcb.200707181.
- Graser, S., Stierhof, Y.-D., Nigg, E. A., and Rattner, J. B. (2007b). Cep68 and Cep215 (Cdk5rap2) are required for centrosome cohesion. *J. Cell Sci.* 120, 4321–31. doi:10.1242/jcs.020248.
- Greber, B., Lehrach, H., and Adjaye, J. (2007). Fibroblast Growth Factor 2 Modulates Transforming

- Growth Factor β Signaling in Mouse Embryonic Fibroblasts and Human ESCs (hESCs) to Support hESC Self-Renewal. *Stem Cells* 25, 455–464. doi:10.1634/stemcells.2006-0476.
- Groves, A. K. (2010). The challenge of hair cell regeneration. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 235, 434–46. doi:10.1258/ebm.2009.009281.
- Gurdon, J. B. (1962). The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles. doi:10: 622-640.
- Haag, N., Schüler, S., Nietzsche, S., Hübner, C. A., Strenzke, N., Qualmann, B., et al. (2018). The Actin Nucleator Cobl Is Critical for Centriolar Positioning, Postnatal Planar Cell Polarity Refinement, and Function of the Cochlea. *Cell Rep.* 24, 2418–2431.e6. doi:10.1016/J.CELREP.2018.07.087.
- Habibi, E., Brinkman, A. B., Arand, J., Kroeze, L. I., Kerstens, H. H. D., Matarese, F., et al. (2013). Whole-genome bisulfite sequencing of two distinct interconvertible DNA methylomes of mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 13, 360–369. doi:10.1016/j.stem.2013.06.002.
- Hann, S. R. (2014). MYC cofactors: molecular switches controlling diverse biological outcomes. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4, a014399. doi:10.1101/cshperspect.a014399.
- Hassler, M. R., Redl, E., Hudson, Q. J., and Miller, W. J. (2016). Basic Epigenetic Mechanisms and Phenomena. *Drug Discov. Cancer Epigenetics*, 3–40. doi:10.1016/B978-0-12-802208-5.00001-1.
- Hay, D. C., Sutherland, L., Clark, J., and Burdon, T. (2004). Oct-4 Knockdown Induces Similar Patterns of Endoderm and Trophoblast Differentiation Markers in Human and Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 22, 225–235. doi:10.1634/stemcells.22-2-225.
- Hearn, T., Spalluto, C., Phillips, V. J., Renforth, G. L., Copin, N., Hanley, N. A., et al. (2005). Subcellular localization of ALMS1 supports involvement of centrosome and basal body dysfunction in the pathogenesis of obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Diabetes* 54, 1581–7. doi:10.2337/DIABETES.54.5.1581.
- Hertzano, R., Montcouquiol, M., Rashi-Elkeles, S., Elkon, R., Yücel, R., Frankel, W. N., et al. (2004). Transcription profiling of inner ears from Pou4f3ddl/ddl identifies Gfi1 as a target of the Pou4f3 deafness gene. *Hum. Mol. Genet.* 13, 2143–2153. doi:10.1093/hmg/ddh218.
- Hildebrandt, F., Benzing, T., and Katsanis, N. (2011). Ciliopathies. *N. Engl. J. Med.* 364, 1533–43. doi:10.1056/NEJMra1010172.
- Hollander, S. A., Alsaleh, N., Ruzhnikov, M., Jensen, K., Rosenthal, D. N., Stevenson, D. A., et al. (2017). Variable clinical course of identical twin neonates with Alström syndrome presenting coincidentally with dilated cardiomyopathy. *Am. J. Med. Genet. Part A* 173, 1687–1689. doi:10.1002/ajmg.a.38200.
- Hollnagel, A., Oehlmann, V., Heymer, J., Rütger, U., and Nordheim, A. (1999). Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 274, 19838–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10391928> [Accessed November 14, 2018].
- Hosoya, M., Fujioka, M., Sone, T., Okamoto, S., Akamatsu, W., Ukai, H., et al. (2017). Cochlear Cell Modeling Using Disease-Specific iPSCs Unveils a Degenerative Phenotype and Suggests Treatments for Congenital Progressive Hearing Loss. *Cell Rep.* 18, 68–81. doi:10.1016/j.celrep.2016.12.020.
- Hua, K., and Ferland, R. J. (2018). Primary Cilia Reconsidered in the Context of Ciliopathies: Extraciliary and Ciliary Functions of Cilia Proteins Converge on a Polarity theme? *BioEssays* 40, 1700132. doi:10.1002/bies.201700132.
- Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A. E., et al. (2008). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat. Biotechnol.* 26, 795–797. doi:10.1038/nbt1418.
- Hudspeth, A. J. (2014). Integrating the active process of hair cells with cochlear function. *Nat. Publ. Gr.* 15. doi:10.1038/nrn3786.
- Hung, L. Y., Tang, C. J., and Tang, T. K. (2000). Protein 4.1 R-135 interacts with a novel centrosomal

- protein (CPAP) which is associated with the gamma-tubulin complex. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7813–25. doi:10.1128/MCB.20.20.7813-7825.2000.
- Hyslop, L., Stojkovic, M., Armstrong, L., Walter, T., Stojkovic, P., Przyborski, S., et al. (2005). Downregulation of NANOG Induces Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Extraembryonic Lineages. *Stem Cells* 23, 1035–1043. doi:10.1634/stemcells.2005-0080.
- Issa, L., Mueller, K., Seufert, K., Kraemer, N., Rosenkotter, H., Ninnemann, O., et al. (2013). Clinical and cellular features in patients with primary autosomal recessive microcephaly and a novel CDK5RAP2 mutation. *Orphanet J. Rare Dis.* 8, 59. doi:10.1186/1750-1172-8-59.
- Jagger, D., Collin, G., Kelly, J., Towers, E., Nevill, G., Longo-Guess, C., et al. (2011). Alström Syndrome protein ALMS1 localizes to basal bodies of cochlear hair cells and regulates cilium-dependent planar cell polarity. *Hum. Mol. Genet.* 20, 466–481. doi:10.1093/hmg/ddq493.
- James, D., Levine, A. J., Besser, D., and Hemmati-Brivanlou, A. (2005). TGF /activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development* 132, 1273–1282. doi:10.1242/dev.01706.
- Jeon, E.-J., Xu, N., Xu, L., and Hansen, M. R. (2011). Influence of central glia on spiral ganglion neuron neurite growth. *Neuroscience* 177, 321–334. doi:10.1016/J.NEUROSCIENCE.2011.01.014.
- Joshi, O., Wang, S. Y., Kuznetsova, T., Atlasi, Y., Peng, T., Fabre, P. J., et al. (2015). Dynamic Reorganization of Extremely Long-Range Promoter-Promoter Interactions between Two States of Pluripotency. *Cell Stem Cell* 17, 748–757. doi:10.1016/j.stem.2015.11.010.
- Kalatzis, V., and Petit, C. (1998). The fundamental and medical impacts of recent progress in research on hereditary hearing loss. *Hum. Mol. Genet.* 7, 1589–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9735380> [Accessed February 21, 2019].
- Kawamura, T., Suzuki, J., Wang, Y. V., Menendez, S., Morera, L. B., Raya, A., et al. (2009). Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 460, 1140–1144. doi:10.1038/nature08311.
- Kelley, M. W. (2006). Regulation of cell fate in the sensory epithelia of the inner ear. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 837–849. doi:10.1038/nrn1987.
- Kempfle, J. S., Turban, J. L., and Edge, A. S. B. (2016). Sox2 in the differentiation of cochlear progenitor cells. *Sci. Rep.* 6, 23293. doi:10.1038/srep23293.
- Keryer, G., Witczak, O., Delouvé, A., Kemmner, W. A., Rouillard, D., Taskén, K., et al. (2003). Dissociating the Centrosomal Matrix Protein AKAP450 from Centrioles Impairs Centriole Duplication and Cell Cycle Progression. *Mol. Biol. Cell* 14, 2436–2446. doi:10.1091/mbc.e02-09-0614.
- Kim, E. J. Y., Anko, M.-L., Flensberg, C., Majewski, I. J., Geng, F.-S., Firas, J., et al. (2018). BAK/BAX-Mediated Apoptosis Is a Myc-Induced Roadblock to Reprogramming. *Stem Cell Reports* 10, 331–338. doi:10.1016/J.STEMCR.2017.12.019.
- Kim, J., Chu, J., Shen, X., Wang, J., and Orkin, S. H. (2008). An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell* 132, 1049–61. doi:10.1016/j.cell.2008.02.039.
- Kim, S., and Rhee, K. (2014). Importance of the CEP215-Pericentrin Interaction for Centrosome Maturation during Mitosis. *PLoS One* 9, e87016. doi:10.1371/journal.pone.0087016.
- Knorz, V. J., Spalluto, C., Lessard, M., Purvis, T. L., Adigun, F. F., Collin, G. B., et al. (2010). Centriolar Association of ALMS1 and Likely Centrosomal Functions of the ALMS Motif-containing Proteins C10orf90 and KIAA1731. *Mol. Biol. Cell* 21, 3617–3629. doi:10.1091/mbc.e10-03-0246.
- Kodani, A., Yu, T. W., Johnson, J. R., Jayaraman, D., Johnson, T. L., Al-Gazali, L., et al. (2015). Centriolar satellites assemble centrosomal microcephaly proteins to recruit CDK2 and promote centriole duplication. *Elife* 4. doi:10.7554/eLife.07519.
- Koehler, K. R., and Hashino, E. (2014). 3D mouse embryonic stem cell culture for generating inner ear organoids. *Nat. Protoc.* 9, 1229–1244. doi:10.1038/nprot.2014.100.

- Koehler, K. R., Mikosz, A. M., Molosh, A. I., Patel, D., and Hashino, E. (2013). Generation of inner ear sensory epithelia from pluripotent stem cells in 3D culture. *Nature* 500, 217–21. doi:10.1038/nature12298.
- Koehler, K. R., Nie, J., Longworth-Mills, E., Liu, X.-P., Lee, J., Holt, J. R., et al. (2017). Generation of inner ear organoids containing functional hair cells from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 35, 583–589. doi:10.1038/nbt.3840.
- Kraemer, N., Ravindran, E., Zaqout, S., Neubert, G., Schindler, D., Ninnemann, O., et al. (2015). Loss of CDK5RAP2 affects neural but not non-neural mESC differentiation into cardiomyocytes. *Cell Cycle* 14, 2044–2057. doi:10.1080/15384101.2015.1044169.
- Krämer, A., Mailand, N., Lukas, C., Syljuåsen, R. G., Wilkinson, C. J., Nigg, E. A., et al. (2004). Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B–Cdk1 kinase. *Nat. Cell Biol.* 6, 884–891. doi:10.1038/ncb1165.
- Krawchuk, D., Honma-Yamanaka, N., Anani, S., and Yamanaka, Y. (2013). FGF4 is a limiting factor controlling the proportions of primitive endoderm and epiblast in the ICM of the mouse blastocyst. *Dev. Biol.* 384, 65–71. doi:10.1016/j.ydbio.2013.09.023.
- Kubota, D., Gocho, K., Kikuchi, S., Akeo, K., Miura, M., Yamaki, K., et al. (2018). *CEP250* mutations associated with mild cone-rod dystrophy and sensorineural hearing loss in a Japanese family. *Ophthalmic Genet.* 39, 500–507. doi:10.1080/13816810.2018.1466338.
- Laine, H., Sulg, M., Kirjavainen, A., and Pirvola, U. (2010). Cell cycle regulation in the inner ear sensory epithelia: Role of cyclin D1 and cyclin-dependent kinase inhibitors. *Dev. Biol.* 337, 134–146. doi:10.1016/j.ydbio.2009.10.027.
- Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C.-A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurles, M. E., et al. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 501, 373–9. doi:10.1038/nature12517.
- Lanford, P. J., Lan, Y., Jiang, R., Lindsell, C., Weinmaster, G., Gridley, T., et al. (1999). Notch signalling pathway mediates hair cell development in mammalian cochlea. *Nat Genet* 21, 289–292. doi:10.1038/6804.
- Le Bin, G. C., Muñoz-Descalzo, S., Kurowski, A., Leitch, H., Lou, X., Mansfield, W., et al. (2014). Oct4 is required for lineage priming in the developing inner cell mass of the mouse blastocyst. *Development* 141, 1001–10. doi:10.1242/dev.096875.
- Lee, S., Jeong, H.-S., and Cho, H.-H. (2017). Atoh1 as a Coordinator of Sensory Hair Cell Development and Regeneration in the Cochlea. © *Chonnam Med. J. Chonnam Med J* 53, 37–46. doi:10.4068/cmj.2017.53.1.37.
- Lefebvre, P. P., Malgrange, B., Staecker, H., Moonen, G., and Van de Water, T. R. (1993). Retinoic acid stimulates regeneration of mammalian auditory hair cells. *Science* 260, 692–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8480180> [Accessed June 13, 2019].
- Leitch, C. C., Lodh, S., Prieto-Echagüe, V., Badano, J. L., and Zaghoul, N. A. (2014). Basal body proteins regulate Notch signaling through endosomal trafficking. *J. Cell Sci.* 127, 2407–19. doi:10.1242/jcs.130344.
- Leitch, H. G., McEwen, K. R., Turp, A., Encheva, V., Carroll, T., Grabole, N., et al. (2013). Naive pluripotency is associated with global DNA hypomethylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 311–316. doi:10.1038/nsmb.2510.
- Levine, M. S., Bakker, B., Boeckx, B., Moyett, J., Lu, J., Vitre, B., et al. (2017). Centrosome Amplification Is Sufficient to Promote Spontaneous Tumorigenesis in Mammals. *Dev. Cell* 40, 313–322.e5. doi:10.1016/j.devcel.2016.12.022.
- Li, G., Vega, R., Nelms, K., Gekakis, N., Goodnow, C., McNamara, P., et al. (2007a). A role for Alström syndrome protein, *alms1*, in kidney ciliogenesis and cellular quiescence. *PLoS Genet.* 3, e8. doi:10.1371/journal.pgen.0030008.

- Li, H., Roblin, G., Liu, H., and Heller, S. (2003). Generation of hair cells by stepwise differentiation of embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 13495–500. doi:10.1073/pnas.2334503100.
- Li, J., Wang, G., Wang, C., Zhao, Y., Zhang, H., Tan, Z., et al. (2007b). MEK/ERK signaling contributes to the maintenance of human embryonic stem cell self-renewal. *Differentiation* 75, 299–307. doi:10.1111/J.1432-0436.2006.00143.X.
- Lifshitz, V., and Frenkel, D. (2013). TGF- β . *Handb. Biol. Act. Pept.*, 1647–1653. doi:10.1016/B978-0-12-385095-9.00225-6.
- Lim, R., and Brichta, A. M. (2016). Anatomical and physiological development of the human inner ear. *Hear. Res.* 338, 9–21. doi:10.1016/j.heares.2016.02.004.
- Lindsey, S., Brewer, C., Stakhovskaya, O., Kim, H. J., Zalewski, C., Bryant, J., et al. (2017). Auditory and otologic profile of Alström syndrome: Comprehensive single center data on 38 patients. *Am. J. Med. Genet. A* 173, 2210–2218. doi:10.1002/ajmg.a.38316.
- Lindström, L., and Alvarado-Kristensson, M. (2018). Characterization of gamma-tubulin filaments in mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1865, 158–171. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.10.008.
- Link, H., and Xiao, B.-G. (1998). Transforming Growth Factor β (TGF β). *Encycl. Immunol.*, 2392–2399. doi:10.1006/RWEI.1999.0600.
- Liu, X.-P., Koehler, K. R., Mikosz, A. M., Hashino, E., and Holt, J. R. (2016). Functional development of mechanosensitive hair cells in stem cell-derived organoids parallels native vestibular hair cells. *Nat. Commun.* 7, 11508. doi:10.1038/ncomms11508.
- Liu, Z., and Kraus, W. L. (2017). Catalytic-Independent Functions of PARP-1 Determine Sox2 Pioneer Activity at Intractable Genomic Loci. *Mol. Cell* 65, 589-603.e9. doi:10.1016/j.molcel.2017.01.017.
- Lizarraga, S. B., Margossian, S. P., Harris, M. H., Campagna, D. R., Han, A.-P., Blevins, S., et al. (2010). Cdk5rap2 regulates centrosome function and chromosome segregation in neuronal progenitors. *Development* 137, 1907–17. doi:10.1242/dev.040410.
- Loffler, H., Fechter, A., Matuszewska, M., Saffrich, R., Mistrik, M., Marhold, J., et al. (2011). Cep63 Recruits Cdk1 to the Centrosome: Implications for Regulation of Mitotic Entry, Centrosome Amplification, and Genome Maintenance. *Cancer Res.* 71, 2129–2139. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2684.
- Longworth-Mills, E., Koehler, K. R., and Hashino, E. (2016). *Generating inner ear organoids from mouse embryonic stem cells.* doi:10.1007/7651_2015_215.
- Louw, J. J., Corveleyn, A., Jia, Y., Iqbal, S., Boshoff, D., Gewillig, M., et al. (2014). Homozygous loss-of-function mutation in ALMS1 causes the lethal disorder mitogenic cardiomyopathy in two siblings. *Eur. J. Med. Genet.* 57, 532–535. doi:10.1016/J.EJMG.2014.06.004.
- Lu, J., Hou, R., Booth, C. J., Yang, S.-H., and Snyder, M. (2006). Defined culture conditions of human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 5688–5693. doi:10.1073/pnas.0601383103.
- Luo, W.-W., Han, Z., Ren, D.-D., Wang, X.-W., Chi, F.-L., and Yang, J.-M. (2017). Notch pathway inhibitor DAPT enhances Atoh1 activity to generate new hair cells in situ in rat cochleae. *Neural Regen. Res.* 12, 2092–2099. doi:10.4103/1673-5374.221169.
- MacDonald, B. T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* 17, 9–26. doi:10.1016/j.devcel.2009.06.016.
- Mak, I. W., Evaniew, N., and Ghert, M. (2014). Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am. J. Transl. Res.* 6, 114–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24489990> [Accessed September 26, 2018].
- Mak, T. W., Saunders, M. E., Mak, T. W., and Saunders, M. E. (2006). Cytokines and Cytokine Receptors. *The Immune Response*, 463–516. doi:10.1016/B978-012088451-3.50019-3.

- Mardin, B. R., and Schiebel, E. (2012). Breaking the ties that bind: new advances in centrosome biology. *J. Cell Biol.* 197, 11–8. doi:10.1083/jcb.201108006.
- Marión, R. M., Strati, K., Li, H., Murga, M., Blanco, R., Ortega, S., et al. (2009). A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature* 460, 1149–1153. doi:10.1038/nature08287.
- Marks, H., Kalkan, T., Menafrá, R., Denissov, S., Jones, K., Hofemeister, H., et al. (2012). The Transcriptional and Epigenomic Foundations of Ground State Pluripotency. *Cell* 149, 590–604. doi:10.1016/j.cell.2012.03.026.
- Marshall, J. D., Ludman, M. D., Shea, S. E., Salisbury, S. R., Willi, S. M., LaRoche, R. G., et al. (1997). Genealogy, natural history, and phenotype of Alström syndrome in a large Acadian kindred and three additional families. *Am. J. Med. Genet.* 73, 150–161. doi:10.1002/(SICI)1096-8628(19971212)73:2<150::AID-AJMG9>3.0.CO;2-Y.
- Marshall, J. D., Maffei, P., Collin, G. B., and Naggert, J. K. (2011). Alström syndrome: genetics and clinical overview. *Curr. Genomics* 12, 225–35. doi:10.2174/138920211795677912.
- Martignoni, M., Groothuis, G. M. M., and de Kanter, R. (2006). Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2, 875–894. doi:10.1517/17425255.2.6.875.
- Martin Gonzalez, J., Morgani, S. M., Bone, R. A., Bonderup, K., Abelchian, S., Brakebusch, C., et al. (2016). Embryonic Stem Cell Culture Conditions Support Distinct States Associated with Different Developmental Stages and Potency. *Stem Cell Reports* 7, 177–191. doi:10.1016/j.stemcr.2016.07.009.
- Mayshar, Y., Ben-David, U., Lavon, N., Biancotti, J.-C., Yakir, B., Clark, A. T., et al. (2010). Identification and Classification of Chromosomal Aberrations in Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 7, 521–531. doi:10.1016/j.stem.2010.07.017.
- McGrath, J., Roy, P., and Perrin, B. J. (2017). Stereocilia morphogenesis and maintenance through regulation of actin stability. *Semin. Cell Dev. Biol.* 65, 88–95. doi:10.1016/j.semcdb.2016.08.017.
- Megraw, T. L., Sharkey, J. T., and Nowakowski, R. S. (2011). Cdk5rap2 exposes the centrosomal root of microcephaly syndromes. *Trends Cell Biol.* 21, 470–80. doi:10.1016/j.tcb.2011.04.007.
- Michaud, J. L., Héon, E., Guilbert, F., Weill, J., Puech, B., Benson, L., et al. (1996). Natural history of Alström syndrome in early childhood: Onset with dilated cardiomyopathy. *J. Pediatr.* 128, 225–229. doi:10.1016/S0022-3476(96)70394-3.
- Millan, F. A., Denhez, F., Kondaiah, P., and Akhurst, R. J. (1991). Embryonic gene expression patterns of TGF beta 1, beta 2 and beta 3 suggest different developmental functions in vivo. *Development* 111.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., et al. (2003). The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells. *Cell* 113, 631–642. doi:10.1016/S0092-8674(03)00393-3.
- Mizutari, K., Fujioka, M., Hosoya, M., Bramhall, N., Okano, H. J., Okano, H., et al. (2013). Notch Inhibition Induces Cochlear Hair Cell Regeneration and Recovery of Hearing after Acoustic Trauma. *Neuron* 77, 58. doi:10.1016/J.NEURON.2012.10.032.
- Mukhopadhyay, S., and Rohatgi, R. (2014). G-protein-coupled receptors, Hedgehog signaling and primary cilia. *Semin. Cell Dev. Biol.* 33, 63–72. doi:10.1016/j.semcdb.2014.05.002.
- Müller, U., and Barr-Gillespie, P. G. (2015). New treatment options for hearing loss. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 346–365. doi:10.1038/nrd4533.
- Muñoz-Descalzo, S., Hadjantonakis, A.-K., and Arias, A. M. (2015). Wnt/ β -catenin signalling and the dynamics of fate decisions in early mouse embryos and embryonic stem (ES) cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* 47–48, 101–9. doi:10.1016/j.semcdb.2015.08.011.
- Nadol Jr, J. B., Marshall, J. D., and Bronson, R. T. (2015). Histopathology of the Human Inner Ear in

- Alström's Syndrome. *Audiol. Neurotol.* 20, 267–272. doi:10.1159/000381935.
- Nakano, T., Ando, S., Takata, N., Kawada, M., Muguruma, K., Sekiguchi, K., et al. (2012). Self-Formation of Optic Cups and Storable Stratified Neural Retina from Human ESCs. *Cell Stem Cell* 10, 771–785. doi:10.1016/J.STEM.2012.05.009.
- Nance, W. E. (2003). The genetics of deafness. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 9, 109–119. doi:10.1002/mrdd.10067.
- Navarro, P. (2011). Reprogrammation épigénétique. *médecine/sciences* 27, 476–479. doi:10.1051/medsci/2011275010.
- Nawshad, A., Lagamba, D., Polad, A., and Hay, E. D. (2005). Transforming growth factor-beta signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis. *Cells. Tissues. Organs* 179, 11–23. doi:10.1159/000084505.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., et al. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95, 379–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9814708> [Accessed October 26, 2018].
- Nie, J., Koehler, K. R., and Hashino, E. (2017). “Directed Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells Into Inner Ear Sensory Epithelia in 3D Culture,” in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 67–83. doi:10.1007/978-1-4939-6949-4_6.
- Nigg, E. A. (2007). Centrosome duplication: of rules and licenses. *Trends Cell Biol.* 17, 215–221. doi:10.1016/J.TCB.2007.03.003.
- Nigg, E. A., and Raff, J. W. (2009). Centrioles, Centrosomes, and Cilia in Health and Disease. *Cell* 139, 663–678. doi:10.1016/J.CELL.2009.10.036.
- Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* 24, 372–376. doi:10.1038/74199.
- O’rahilly, R. (1963). The Early Development of the Otic Vesicle in Staged Human Embryos. Available at: <https://dev.biologists.org/content/develop/11/4/741.full.pdf> [Accessed July 9, 2019].
- Oesterle, E. C., Campbell, S., Taylor, R. R., Forge, A., and Hume, C. R. (2008). Sox2 and Jagged1 expression in normal and drug-damaged adult mouse inner ear. *JARO - J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 9, 65–89. doi:10.1007/s10162-007-0106-7.
- Ogden, A., Rida, P. C. G., and Aneja, R. (2017). Centrosome amplification: a suspect in breast cancer and racial disparities. *Endocr. Relat. Cancer* 24, T47–T64. doi:10.1530/ERC-17-0072.
- Ohnishi, H., Skerleva, D., Kitajiri, S., Sakamoto, T., Yamamoto, N., Ito, J., et al. (2015). Limited hair cell induction from human induced pluripotent stem cells using a simple stepwise method. *Neurosci. Lett.* 599, 49–54. doi:10.1016/j.neulet.2015.05.032.
- Ornitz, D. M. (2000). FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *BioEssays* 22, 108–112. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(200002)22:2<108::AID-BIES2>3.0.CO;2-M.
- Ornitz, D. M., and Itoh, N. (2015). The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 4, 215–66. doi:10.1002/wdev.176.
- Oshima, K., Shin, K., Diensthuber, M., Peng, A. W., Ricci, A. J., and Heller, S. (2010). Mechanosensitive hair cell-like cells from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell* 141, 704–16. doi:10.1016/j.cell.2010.03.035.
- Ouji, Y., Ishizaka, S., Nakamura-Uchiyama, F., and Yoshikawa, M. (2012). In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells into inner ear hair cell-like cells using stromal cell conditioned medium. *Cell Death Dis.* 3, e314. doi:10.1038/cddis.2012.56.
- Ouji, Y., Sakagami, M., Omori, H., Higashiyama, S., Kawai, N., Kitahara, T., et al. (2017). Efficient induction of inner ear hair cell-like cells from mouse ES cells using combination of Math1 transfection and conditioned medium from ST2 stromal cells. *Stem Cell Res.* 23, 50–56.

- doi:10.1016/j.scr.2017.06.013.
- Pagnamenta, A. T., Murray, J. E., Yoon, G., Sadighi Akha, E., Harrison, V., Bicknell, L. S., et al. (2012). A novel nonsense CDK5RAP2 mutation in a Somali child with primary microcephaly and sensorineural hearing loss. *Am. J. Med. Genet. A* 158A, 2577–82. doi:10.1002/ajmg.a.35558.
- Pallesi-Pocachard, E., Bazellieres, E., Viallat-Lieutaud, A., Delgrossi, M.-H., Barthelemy-Requin, M., Le Bivic, A., et al. (2016). Hook2, a microtubule-binding protein, interacts with Par6 α and controls centrosome orientation during polarized cell migration. *Sci. Rep.* 6, 33259. doi:10.1038/srep33259.
- Papp, B., and Plath, K. (2013). Leading Edge Review Epigenetics of Reprogramming to Induced Pluripotency. doi:10.1016/j.cell.2013.02.043.
- Pedersen, L. B., and Rosenbaum, J. L. (2008). Chapter Two Intraflagellar Transport (IFT): Role in Ciliary Assembly, Resorption and Signalling. *Curr. Top. Dev. Biol.* 85, 23–61. doi:10.1016/S0070-2153(08)00802-8.
- Pelton, R. W., Saxena, B., Jones, M., Moses, H. L., and Gold, L. I. (1991). Immunohistochemical localization of TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 in the mouse embryo: expression patterns suggest multiple roles during embryonic development. *J. Cell Biol.* 115, 1091–105. doi:10.1083/JCB.115.4.1091.
- Pera, E. M., Wessely, O., Li, S. Y., and De Robertis, E. M. (2001). Neural and head induction by insulin-like growth factor signals. *Dev. Cell* 1, 655–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11709186> [Accessed June 6, 2019].
- Petry, S., and Vale, R. D. (2015). Microtubule nucleation at the centrosome and beyond. *Nat. Cell Biol.* 17, 1089–1093. doi:10.1038/ncb3220.
- Pfeffer, P. L. (2018). Building Principles for Constructing a Mammalian Blastocyst Embryo. *Biology (Basel)*. 7. doi:10.3390/biology7030041.
- Pieper, M., Ahrens, K., Rink, E., Peter, A., and Schlosser, G. (2012). Differential distribution of competence for panplacodal and neural crest induction to non-neural and neural ectoderm. *Development* 139, 1175–1187. doi:10.1242/dev.074468.
- Plachta, N., Bollenbach, T., Pease, S., Fraser, S. E., and Pantazis, P. (2011). Oct4 kinetics predict cell lineage patterning in the early mammalian embryo. *Nat. Cell Biol.* 13, 117–123. doi:10.1038/ncb2154.
- Pujol, R., Lavigne-rebillard, M., and Uziel, A. (1991). Development of the human cochlea. *Acta Otolaryngol.* 111, 7–13. doi:10.3109/00016489109128023.
- Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., and et al. (2001). “Two Kinds of Hair Cells in the Cochlea.” in *Neuroscience. 2nd edition*.
- Raphael, Y., and Altschuler, R. A. (2003). Structure and innervation of the cochlea. *Brain Res. Bull.* 60, 397–422. doi:10.1016/S0361-9230(03)00047-9.
- Rasmussen, M. A., Holst, B., Tümer, Z., Johnsen, M. G., Zhou, S., Stummann, T. C., et al. (2014). Transient p53 suppression increases reprogramming of human fibroblasts without affecting apoptosis and DNA damage. *Stem cell reports* 3, 404–13. doi:10.1016/j.stemcr.2014.07.006.
- Reichenbach, T., and Hudspeth, A. J. (2014). The physics of hearing: fluid mechanics and the active process of the inner ear. *Reports Prog. Phys.* 77, 076601. doi:10.1088/0034-4885/77/7/076601.
- Reya, T., and Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 434, 843–850. doi:10.1038/nature03319.
- ROBERTS, A. B., FLANDERS, K. C., KONDAIAH, P., THOMPSON, N. L., VAN OBBERGHEN-SCHILLING, E., WAKEFIELD, L., et al. (1988). Transforming Growth Factor β : Biochemistry and Roles in Embryogenesis, Tissue Repair and Remodeling, and Carcinogenesis. *Proc. 1987 Laurentian Horm. Conf.*, 157–197. doi:10.1016/B978-0-12-571144-9.50010-7.
- Roberts, A. B., and Sporn, M. B. (1992). Differential expression of the TGF- β isoforms in embryogenesis

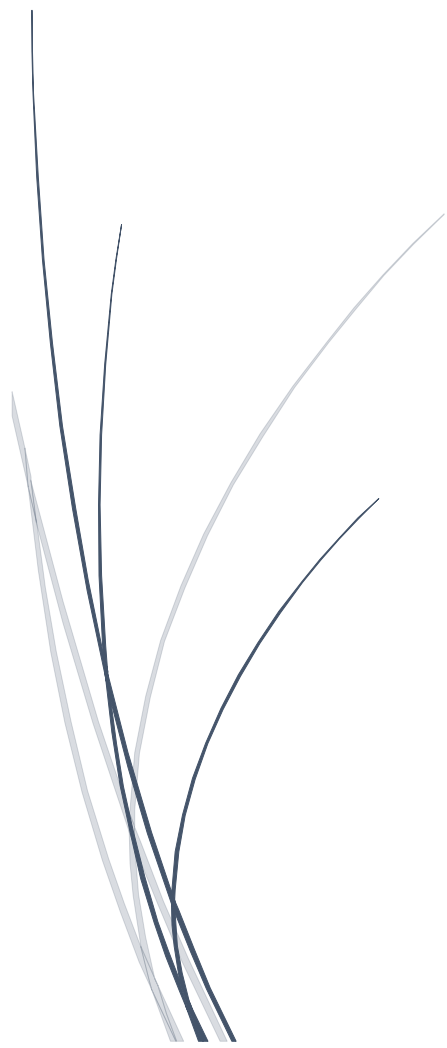
- suggests specific roles in developing and adult tissues. *Mol. Reprod. Dev.* 32, 91–98. doi:10.1002/mrd.1080320203.
- Ronaghi, M., Nasr, M., Ealy, M., Durruthy-Durruthy, R., Waldhaus, J., Diaz, G. H., et al. (2014). Inner ear hair cell-like cells from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 23, 1275–84. doi:10.1089/scd.2014.0033.
- Rosselló, C. A., Lindström, L., Eklund, G., Corvaisier, M., and Kristensson, M. A. (2018). γ -Tubulin γ -Tubulin Interactions as the Basis for the Formation of a Meshwork. *Int. J. Mol. Sci.* 19. doi:10.3390/ijms19103245.
- Rubbini, D., Robert-Moreno, À., Hoijman, E., and Alsina, B. (2015). Retinoic Acid Signaling Mediates Hair Cell Regeneration by Repressing *p27 kip* and *sox2* in Supporting Cells. *J. Neurosci.* 35, 15752–15766. doi:10.1523/JNEUROSCI.1099-15.2015.
- Sandell, L. L., Butler Tjaden, N. E., Barlow, A. J., and Trainor, P. A. (2014). Cochleovestibular nerve development is integrated with migratory neural crest cells. *Dev. Biol.* 385, 200–10. doi:10.1016/j.ydbio.2013.11.009.
- Sarabipour, S., and Hristova, K. (2016). Mechanism of FGF receptor dimerization and activation. *Nat. Commun.* 7, 10262. doi:10.1038/ncomms10262.
- Sato, N., Sanjuan, I. M., Heke, M., Uchida, M., Naef, F., and Brivanlou, A. H. (2003). Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse. *Dev. Biol.* 260, 404–413. doi:10.1016/S0012-1606(03)00256-2.
- Serio, R. N. (2014). Wnt of the Two Horizons: Putting Stem Cell Self-Renewal and Cell Fate Determination into Context. *Stem Cells Dev.* 23, 1975–1990. doi:10.1089/scd.2014.0055.
- Shahbazi, M. N., and Zernicka-Goetz, M. (2018). Deconstructing and reconstructing the mouse and human early embryo. *Nat. Cell Biol.* 20, 878–887. doi:10.1038/s41556-018-0144-x.
- Shakya, A., Callister, C., Goren, A., Yosef, N., Garg, N., Khoddami, V., et al. (2015). Pluripotency transcription factor Oct4 mediates stepwise nucleosome demethylation and depletion. *Mol. Cell. Biol.* 35, 1014–25. doi:10.1128/MCB.01105-14.
- Shenje, L. T., Andersen, P., Halushka, M. K., Lui, C., Fernandez, L., Collin, G. B., et al. (2014). Mutations in Alström Protein Impair Terminal Differentiation of Cardiomyocytes. *Nat. Commun.* 5, 3416. doi:10.1038/NCOMMS4416.
- Shi, Y., and Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell* 113, 685–700. doi:10.1016/S0092-8674(03)00432-X.
- Sjöblom, B., Salmazo, A., and Djinović-Carugo, K. (2008). α -Actinin structure and regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2688–2701. doi:10.1007/s00018-008-8080-8.
- Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M., et al. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336, 688–690. doi:10.1038/336688a0.
- Smith, R. J., Bale, J. F., and White, K. R. (2005). Sensorineural hearing loss in children. *Lancet* 365, 879–890. doi:10.1016/S0140-6736(05)71047-3.
- Soufi, A., Donahue, G., and Zaret, K. S. (2012). Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell* 151, 994–1004. doi:10.1016/j.cell.2012.09.045.
- Soufi, A., Garcia, M. F., Jaroszewicz, A., Osman, N., Pellegrini, M., and Zaret, K. S. (2015). Pioneer Transcription Factors Target Partial DNA Motifs on Nucleosomes to Initiate Reprogramming. *Cell* 161, 555. doi:10.1016/J.CELL.2015.03.017.
- Spike, B. T., and Wahl, G. M. (2011). p53, Stem Cells, and Reprogramming: Tumor Suppression beyond Guarding the Genome. *Genes Cancer* 2, 404–19. doi:10.1177/1947601911410224.
- Stadtfeld, M., Apostolou, E., Ferrari, F., Choi, J., Walsh, R. M., Chen, T., et al. (2012). Ascorbic acid prevents loss of *Dlk1-Dio3* imprinting and facilitates generation of all-iPS cell mice from terminally

- differentiated B cells. *Nat. Genet.* 44, 398–405, S1-2. doi:10.1038/ng.1110.
- Stewart, R., Stojkovic, M., and Lako, M. (2006). Mechanisms of self-renewal in human embryonic stem cells. *Eur. J. Cancer* 42, 1257–1272. doi:10.1016/J.EJCA.2006.01.033.
- Surzenko, N., Crowl, T., Bachleda, A., Langer, L., and Pevny, L. (2013). SOX2 maintains the quiescent progenitor cell state of postnatal retinal Muller glia. *Development* 140, 1445–56. doi:10.1242/dev.071878.
- Taguchi, A., and Nishinakamura, R. (2017). Organ Regeneration Based on Developmental Biology. 257. doi:10.1007/978-981-10-3768-9.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., et al. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131, 861–872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–76. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Tang, Z.-H., Chen, J.-R., Zheng, J., Shi, H.-S., Ding, J., Qian, X.-D., et al. (2016). Genetic Correction of Induced Pluripotent Stem Cells From a Deaf Patient With MYO7A Mutation Results in Morphologic and Functional Recovery of the Derived Hair Cell-Like Cells. *Stem Cells Transl. Med.* 5, 561–571. doi:10.5966/sctm.2015-0252.
- Taura, A., Ohnishi, H., Ochi, S., Ebisu, F., Nakagawa, T., and Ito, J. (2014). Effects of mouse utricle stromal tissues on hair cell induction from induced pluripotent stem cells. 1–6. doi:10.1186/s12868-014-0121-7.
- Tesar, P. J., Chenoweth, J. G., Brook, F. A., Davies, T. J., Evans, E. P., Mack, D. L., et al. (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448, 196–199. doi:10.1038/nature05972.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., et al. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9804556> [Accessed September 21, 2017].
- Tilney, L. G., Tilney, M. S., and Derosier, D. J. (1992). ACTIN FILAMENTS, STEREOCILIA, AND HAIR CELLS: How Cells Count and Measure. Available at: www.annualreviews.org [Accessed November 2, 2018].
- Tobin, J. L., and Beales, P. L. (2009). The nonmotile ciliopathies. *Genet. Med.* 11, 386–402. doi:10.1097/GIM.0b013e3181a02882.
- Trimborn, M., Bell, S. M., Felix, C., Rashid, Y., Jafri, H., Griffiths, P. D., et al. (2004). Mutations in Microcephalin Cause Aberrant Regulation of Chromosome Condensation. *Am. J. Hum. Genet.* 75, 261–266. doi:10.1086/422855.
- Vallier, L., and Pedersen, R. A. (2005). Human Embryonic Stem Cells: An In Vitro Model to Study Mechanisms Controlling Pluripotency in Early Mammalian Development. *Stem Cell Rev.* 1, 119–130. doi:10.1385/SCR:1:2:119.
- Verloes, A., Drunat, S., Gressens, P., and Passemard, S. (2013). Primary Autosomal Recessive Microcephalies and Seckel Syndrome Spectrum Disorders. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9587/> [Accessed December 17, 2018].
- Vitre, B., Holland, A. J., Kulukian, A., Shoshani, O., Hirai, M., Wang, Y., et al. (2015). Chronic centrosome amplification without tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E6321-30. doi:10.1073/pnas.1519388112.
- Vulprecht, J., David, A., Tibelius, A., Castiel, A., Konotop, G., Liu, F., et al. (2012). STIL is required for centriole duplication in human cells. *J. Cell Sci.* 125, 1353–62. doi:10.1242/jcs.104109.
- Wallingford, J. B. (2010). Planar cell polarity signaling, cilia and polarized ciliary beating. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 597–604. doi:10.1016/j.ceb.2010.07.011.
- Wang, Z., Wu, T., Shi, L., Zhang, L., Zheng, W., Qu, J. Y., et al. (2010). Conserved motif of CDK5RAP2

- mediates its localization to centrosomes and the Golgi complex. *J. Biol. Chem.* 285, 22658–65. doi:10.1074/jbc.M110.105965.
- Ware, C. B., Nelson, A. M., Mecham, B., Hesson, J., Zhou, W., Jonlin, E. C., et al. (2014). Derivation of naive human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 4484–9. doi:10.1073/pnas.1319738111.
- Ware, S. M., Aygun, M. G., and Hildebrandt, F. (2011). Spectrum of Clinical Diseases Caused By Disorders of Primary Cilia. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 8, 444. doi:10.1513/PATS.201103-025SD.
- Welsh, L. W. (2007). Alström Syndrome: Progressive Deafness and Blindness. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 116, 281–285. doi:10.1177/000348940711600411.
- Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P., et al. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336, 684–687. doi:10.1038/336684a0.
- Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., and Campbell, K. H. S. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810–813. doi:10.1038/385810a0.
- Wu, D. K., and Kelley, M. W. (2012). Molecular mechanisms of inner ear development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a008409. doi:10.1101/cshperspect.a008409.
- Wu, G., and Schöler, H. R. (2014). Role of Oct4 in the early embryo development. *Cell Regen. (London, England)* 3, 7. doi:10.1186/2045-9769-3-7.
- Wu, M. Y., and Hill, C. S. (2009). TGF- β Superfamily Signaling in Embryonic Development and Homeostasis. *Dev. Cell* 16, 329–343. doi:10.1016/J.DEVCEL.2009.02.012.
- Yamanaka, Y., Lanner, F., and Rossant, J. (2010). FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. *Development* 137, 715–24. doi:10.1242/dev.043471.
- Yang, J., Gao, J., Adamian, M., Wen, X.-H., Pawlyk, B., Zhang, L., et al. (2005). The ciliary rootlet maintains long-term stability of sensory cilia. *Mol. Cell. Biol.* 25, 4129–37. doi:10.1128/MCB.25.10.4129-4137.2005.
- Ying, Q.-L., Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A. (2003). BMP Induction of Id Proteins Suppresses Differentiation and Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal in Collaboration with STAT3. *Cell* 115, 281–292. doi:10.1016/S0092-8674(03)00847-X.
- Ying, Q. L., and Smith, A. (2017). The Art of Capturing Pluripotency: Creating the Right Culture. *Stem Cell Reports* 8, 1457–1464. doi:10.1016/j.stemcr.2017.05.020.
- Yoon, H. S., Chen, X., and Yang, V. W. (2003). Kruppel-like factor 4 mediates p53-dependent G1/S cell cycle arrest in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* 278, 2101–5. doi:10.1074/jbc.M211027200.
- Yoshikawa, M., and Oujji, Y. (2016). “Induction of inner ear hair cells from mouse embryonic stem cells in vitro,” in *Methods in Molecular Biology*, 257–267. doi:10.1007/7651_2016_328.
- Zafarana, G., Avery, S. R., Avery, K., Moore, H. D., and Andrews, P. W. (2009). Specific knockdown of OCT4 in human embryonic stem cells by inducible short hairpin RNA interference. *Stem Cells* 27, 776–82. doi:10.1002/stem.5.
- Zhai, X., Liu, C., Zhao, B., Wang, Y., and Xu, Z. (2018). Inactivation of Cyclin-Dependent Kinase 5 in Hair Cells Causes Hearing Loss in Mice. *Front. Mol. Neurosci.* 11, 461. doi:10.3389/fnmol.2018.00461.
- Zhang, J., and Wang, Y.-L. (2017). Centrosome defines the rear of cells during mesenchymal migration. *Mol. Biol. Cell* 28, 3240–3251. doi:10.1091/mbc.E17-06-0366.
- Zhang, K. D., and Coate, T. M. (2017). Recent advances in the development and function of type II spiral ganglion neurons in the mammalian inner ear. *Semin. Cell Dev. Biol.* 65, 80–87. doi:10.1016/J.SEMCDB.2016.09.017.
- Zhong, C., Fu, Y., Pan, W., Yu, J., and Wang, J. (2019). Atoh1 and other related key regulators in the development of auditory sensory epithelium in the mammalian inner ear: function and interplay.

- Dev. Biol.* 446, 133–141. doi:10.1016/J.YDBIO.2018.12.025.
- Zine, E. A., and Romand, R. (1993). Expression of alpha-actinin in the stereocilia of hair cells of the inner ear: immunohistochemical localization. *Neuroreport* 4, 1350–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8260618> [Accessed July 8, 2019].
- Zou, D., Silvius, D., Fritsch, B., and Xu, P.-X. (2004). Eya1 and Six1 are essential for early steps of sensory neurogenesis in mammalian cranial placodes. *Development* 131, 5561–72. doi:10.1242/dev.01437.
- Zou, D., Silvius, D., Rodrigo-Blomqvist, S., Enerbäck, S., and Xu, P.-X. (2006). Eya1 regulates the growth of otic epithelium and interacts with Pax2 during the development of all sensory areas in the inner ear. *Dev. Biol.* 298, 430–41. doi:10.1016/j.ydbio.2006.06.049.
- Zulato, E., Favaretto, F., Veronese, C., Campanaro, S., Marshall, J. D., Romano, S., et al. (2011). ALMS1-deficient fibroblasts over-express extra-cellular matrix components, display cell cycle delay and are resistant to apoptosis. *PLoS One* 6, e19081. doi:10.1371/journal.pone.0019081.

Annexes



Pluripotent stem cell- derived cochlear cells: a challenge in constant progress

Amandine Czajkowski¹ · Anaïs Mounier¹ · Laurence Delacroix¹ · Brigitte Malgrange¹ 

Received: 29 June 2018 / Revised: 27 September 2018 / Accepted: 15 October 2018

© Springer Nature Switzerland AG 2018

Abstract

Hearing loss is a common affection mainly resulting from irreversible loss of the sensory hair cells of the cochlea; therefore, developing therapies to replace missing hair cells is essential. Understanding the mechanisms that drive their formation will not only help to unravel the molecular basis of deafness, but also give a roadmap for recapitulating hair cells development from cultured pluripotent stem cells. In this review, we provide an overview of the molecular mechanisms involved in hair cell production from both human and mouse embryonic stem cells. We then provide insights how this knowledge has been applied to differentiate induced pluripotent stem cells into otic progenitors and hair cells. Finally, we discuss the current limitations for properly obtaining functional hair cell in a Petri dish, as well as the difficulties that have to be overcome prior to consider stem cell therapy as a potential treatment for hearing loss.

Keywords Stem cells · Differentiation · Inner ear · Otic progenitors · Hair cells


Introduction

Hearing loss affects more than 16% of the worldwide population and this percentage may increase as a result of increased life expectancy. For the majority of patients, irreversible deafness results from an alteration of the auditory portion of the inner ear, the so-called sensorineural hearing loss. This type of deafness is mainly due to a loss of hair cells, the sensory cells that transform the mechanical signal of sound waves into electrical signals. The survival of hair cells can be impaired by exposure to loud sounds, environmental toxins or ototoxic drugs, and mutations in numerous genes can also contribute to their death. Unfortunately, the absence of hair cells prevents sound amplification provided by hearing aids. Moreover, the lack of hair cells and the essential neurotrophic factors they secrete lead secondarily to spiral ganglion neuron death, precluding the use of cochlear implants since these otic neurons constitute the first auditory relay to the central nervous system. Therefore,

there is a need to develop stem cell therapy to be able to replace missing hair cells. In this review, we first provide a brief overview of the main steps involved in hair cell formation *in vivo*. We then describe impressive progress made to date in differentiating stem cells into hair cell-like cells, but also the numerous hurdles that still have to be considered and overcome before considering stem cell therapy to treat deafness.

Embryonic development of the cochlea

Understanding the molecular mechanisms underlying inner ear development is crucial to enable the successful differentiation of pluripotent stem cells into hair cells *in vitro*. At the beginning of mammalian embryonic development, the fertilized egg—the zygote—undergoes a series of duplications to form the blastocyst, a structure composed of the trophoblast and the inner cell mass, which will give rise to the extraembryonic tissues and the embryo, respectively. The pluripotent inner cell mass cells will then generate the three germ layers. The first step of the inner ear development consists of the formation of the non-neural ectoderm (NNE) (Fig. 1), a part of the anterior ectoderm. The ectodermal germ layer starts to differentiate into NNE following BMP signalling activation around embryonic day 6.5–7.5

 Brigitte Malgrange
bmalgrange@uliege.be

¹ Developmental Neurobiology Unit, GIGA-Neurosciences, University of Liège, Quartier Hôpital (CHU), Avenue Hippocrate 15, Tour 4, 1er étage, Bât. B36, 4000 Liège, Belgium

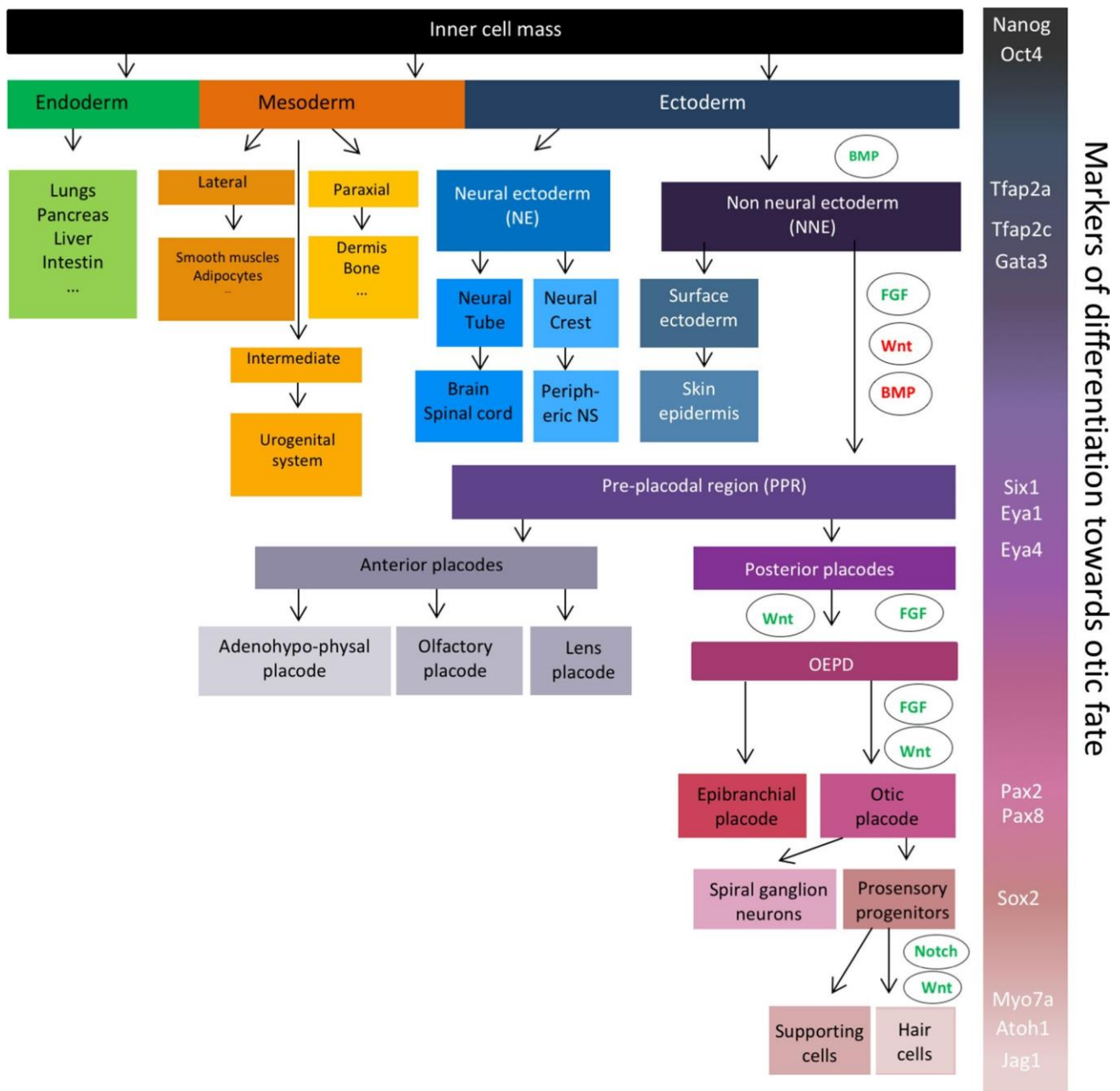


Fig. 1 Different steps of embryonic development from the blastocyst to the inner ear hair cells. Pluripotent inner cell mass of the blastocyst can generate the three germ layers: the endoderm, the mesoderm and the ectoderm. Transient BMP activation induces the differentiation of the ectoderm into the non-neural ectoderm (NNE), characterised by the expression of *Tfap2a*, *Tfap2c*, and *Gata3*. Combination of FGF activation, and Wnt and BMP inhibition leads to the formation of the preplacodal region (PPR) expressing *Six 1*, *Eya1* and *Eya4* transcription factors. The difference cranial sensory organs arise from this PPR. Its most posterior part, the otic and epibranchial

placode domain (OEPD) further differentiates into the otic placode under the control of FGF and Wnt pathways. Some otic placode-derived progenitors will then differentiate into spiral ganglion neurons as other will proliferate in a region called the prosensory domain to give rise to the *Sox2*-positive prosensory progenitors. Through lateral inhibition of Notch signalling pathway, those progenitors will differentiate into hair cells and supporting cells

(E6.5–7.5) in mice [1] and approximately around E17–18 in humans [2]. The NNE is characterised by the expression of different transcription factors, including *Tfap2a*, *Tfap2c*, *Foxi1* and *Gata3*. The successive inhibition of BMP and

Wnt pathways together with the activation of FGF signalling allows the formation of the preplacodal region (PPR) within the NNE [1, 3]. Several genes can be used as markers of the PPR, such as *Six1*, *Six4*, *Eya1* and *Eya4* [4]. The PPR further

differentiates into patches that will give rise to the different cranial sensory organs around E8–9 in mice and E22 in humans. The combined expression of *Pax8* and *Pax2* defines the otic epibranchial placode domain (OEPD) [5, 6]. The specification of the otic placode from the OEPD is mediated by Wnt signalling that induces an increase of *Pax2* expression [7]. Between E10 and E12 in mice, Sox2-positive otic progenitor cells proliferate in a region called the prosensory domain and will progressively become post-mitotic according to an apex-to-base wave [8]. Shortly after cell cycle exit, the Sox2-positive otic progenitors differentiate either in sensory hair cells or in supporting cells in an opposite base-to-apex wave [9–11]. The hair cell fate is profoundly linked to the expression of the transcription factor *Atoh1*. Indeed, *Atoh1* is initially expressed in nascent hair cells and activates its own transcription, as well as the expression of hair cell specific genes such as *Pou4f3* [12]. Moreover, lateral inhibition of *Atoh1* mediated by Notch signalling pathway leads to the differentiation of adjacent cells into supporting cells. Hair cells express Notch ligands—such as DELTA-1 or JAGGED-2—that will activate trans-membrane Notch receptors of adjacent cells and lead to the upregulation of transcriptional inhibitors of *Atoh1* such as *Hes1* or *Hes5* [13, 14]. First hair cells appear around E15.5 in mice and around the gestational weeks 10–11 in humans, and are classically identified with specific markers such as parvalbumin, Myosin 6 (MYO6) or Myosin 7a (MYO7A). Supporting cells can be identified following immunostaining with P27KIP1, HES5 or SOX2 antibodies [15].

Mouse embryonic stem cells

Mouse embryonic stem cells (mESCs) have been cultured for the first time in 1981 [16] on a feeder layer of mitotically inactivated mouse embryonic fibroblasts (MEFs) in presence of fetal calf serum (FCS). Several years later, feeder-free cultures of mESCs appeared following the identification of leukemia inhibitory factor (LIF) as the main factor secreted by fibroblasts [17, 18]. Later on, the activation of Wnt signalling using a GSK3 inhibitor has been reported to stimulate self-renewal of mESCs [19, 20]. In addition, the combination of CHIR99021 (CHIR), a highly selective GSK3 inhibitor, with a MEK1/2 inhibitor (PD0325901) preserves the pluripotent and proliferative state of mESCs [20]. This so-called 2i medium replaces efficiently FCS to maintain mESCs in culture.

It has been shown that mESCs display important transcriptomic and DNA methylation differences depending on the medium used for their maintenance [21–23]. It seems that when maintained in 2i/LIF medium, mESCs are close to E3.75–E4.5 pre-implantation embryonic cells and are the so-called ground or naïve stem cells. When mESCs are

cultured in serum/LIF condition, they present a pluripotency state closer to the one of post-implantation blastocyst cells, called epiblast stem cells or EpiSCs [24]. Interestingly, it is possible to switch from one condition to another in one passage just by changing the culture medium [25, 26]. It has been recently reported that culturing mESCs in 2i medium dramatically impacts their developmental potential and their chromosomal stability due to the long-term inhibition of MEK1/2. However, it seems that this issue can be overcome using a Src inhibitor instead of a MEK1/2 inhibitor [27].

Hair cell differentiation from mESCs

Over the years, numerous protocols have been developed to differentiate mESCs into hair cells (Fig. 2). For all of them, an initial step of embryonic bodies (EBs) formation is performed prior to culturing cells in adherent conditions to trigger the differentiation toward an ectodermal fate, confirming that EBs promote the secretion of differentiation factors. Several factors can be added to support the anterior ectodermal induction, e.g. transforming growth factor beta (TGF- β) and Wnt inhibitors, known to induce ectodermal fate, or insulin-like growth factor 1 (IGF-1), promoting anterior ectoderm formation [28–32]. Activation of the FGF signalling pathway seems to be necessary for otic induction as it increases the expression level of different otic markers such as *Pax2*, *Pax8* or *Six1* [28–32]. Withdrawal of growth factors and serum was sufficient to observe specific markers of hair cells such as MYO7A and ESPIN [28]. Co-culture with different stromal cell types, including inactivated chicken utricle or mouse bone marrow ST2 line, helps to further differentiate the otic progenitors into more mature hair cells that harbour electrophysiologically functional hair bundles at their apical surface [30, 32, 33].

To be closer to *in vivo* embryogenesis, 3D culture models recently emerged with the advantage to favour self-organisation of cells, the only way to obtain mature cell types *in vitro*. In these protocols, aiming at reproducing all the developmental steps leading to otic placode differentiation, mESCs are cultured on ultra-low adherence plates to form aggregates. EBs are then exposed to TGF- β inhibitor (SB-431542) and BMP4 for a short period to induce a NNE fate. Cells are treated with BMP inhibitor (LDN-193189) to give rise to PPR cells and with FGF2 to direct them towards OEPD stage. This differentiation protocol considerably shortens the process of generating OEPD cells, as they are obtained after only 8 days in culture. At that time, aggregates are cultured in a maturation medium containing a Wnt activator (CHIR99021) and cells continue their self-organisation in complex structures. After 12 days of maturation, aggregates present inner ear organoids containing a high number

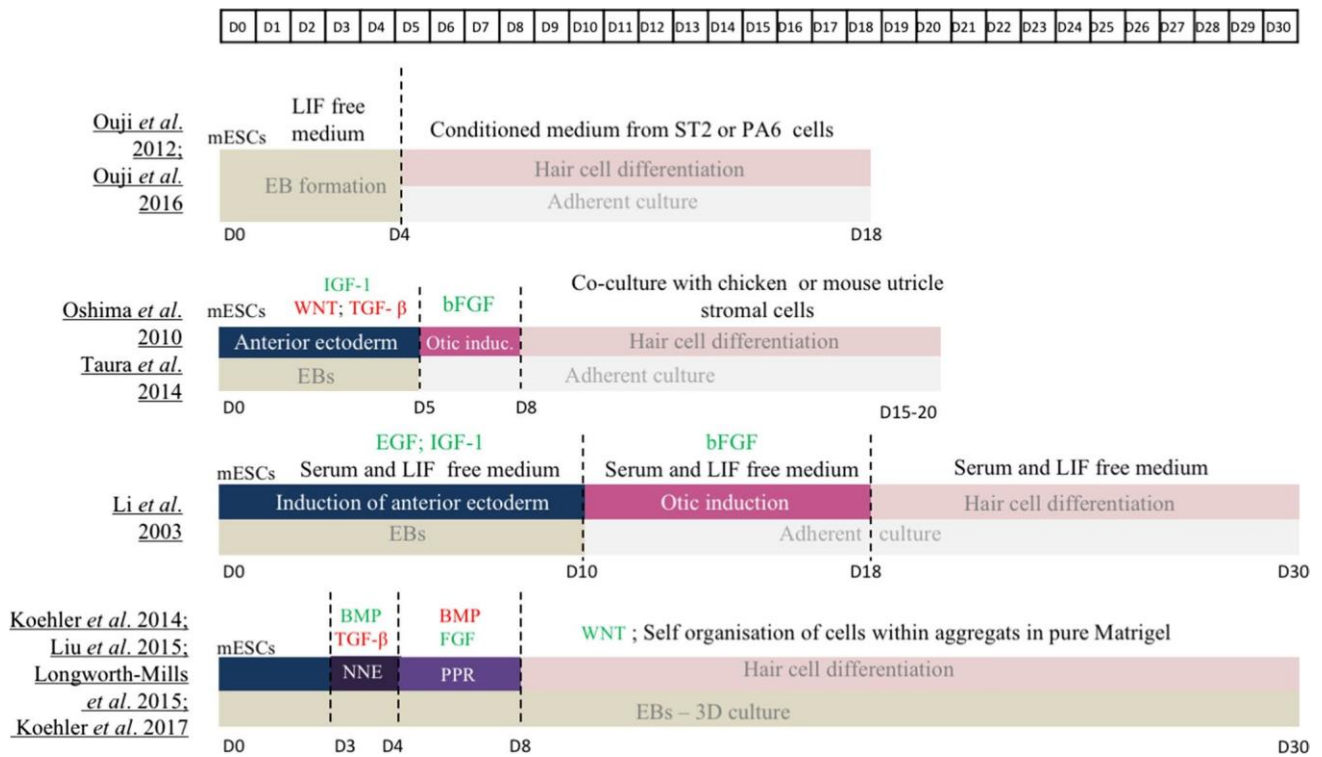


Fig. 2 Comparison of published protocols for hair cell-like cells differentiation of mESCs. *BMP* bone morphogenetic protein, *EB* embryoid bodies, *EGF* epidermal growth factor, *FGF* fibroblast growth

factor, *IGF-1* insulin-like growth factor-1, *LIF* leukemia inhibitory factor, *mESCs* mouse embryonic stem cells, *NNE* non neural ectoderm, *PPR* pre placodal region, *TGF-β* transforming growth factor-β

of mechanosensitive hair cells (around 1500 per aggregate) but also cells expressing supporting cell markers [1, 34–36].

Human models

Mouse models are powerful research tools to study developmental mechanisms as well as pathologies. However, many fundamental disparities exist between mice and human. Considering the inner ear development, the mouse cochlea is still immature at birth, while human cochlea is completely functional at embryonic week 20. Moreover, numerous promising drugs failed to translate into the clinic mainly due to large discrepancies between mouse and human intracellular machinery. Several studies showed that genetic, molecular, immunologic and anatomic differences between humans and rodents hinder the ability to effectively mimic disease and predict toxicity [37–39]. Therefore, both human embryonic stem cells (hESCs) and human-induced pluripotent stem cells (hiPSCs) constitute a unique opportunity to create human-specific models.

Human embryonic stem cells (hESCs) were derived for the first time in 1998 by James Thomson and co-workers from human blastocysts [40]. These hESCs share common characteristics with mESCs, such as their capacity to

proliferate indefinitely and their pluripotent status. However, major differences between mouse and human early embryonic development exist, especially regarding the extra-embryonic structures, and suggest that significant differences could also exist between hESCs and mESCs. While both ES cells can be maintained in an undifferentiated state on MEF feeder cells, feeder-free cultures supplemented by LIF are not appropriate to maintain pluripotency of hESCs [40, 41], suggesting that other factors play a role to ensure their stem cell identity. The inability to maintain hESCs in 2i medium reinforces this hypothesis.

Induced pluripotent stem cells

Although working with ESCs was a major step forward in disease modeling and a promising tool to find new therapeutic approaches, the ethical considerations surrounding the use of ESCs but also their non-autologous state limits their potential for clinical applications. Takahashi and Yamanaka have overcome this issue in 2006 and 2007 with the transduction of mouse or human fibroblasts with four key transcription factors, *C-MYC*, *KLF4*, *SOX2* and *OCT3/4*, inducing their successful reprogramming. This process resulted in induced pluripotent stem cells (iPSCs) that have self-renewal and pluripotency properties comparable to ESCs [42, 43].

While *SOX2* and *OCT3/4* directly act to maintain pluripotency [44, 45], the roles of the two tumour-related factors *C-MYC* and *KLF4* are less clear. It seems that *C-MYC* may allow the binding of *OCT3/4* and *SOX2* to their target genes through histone acetylation [46], while *KLF4* might reduce apoptosis associated to *C-MYC* activation [42, 43]. However, in addition to the use of these two tumour-related factors, this reprogramming technique involves retroviral vectors that are integrated in the host genome, increasing the risk of mutagenesis and cancer and limiting their potential for clinical applications [47]. Therefore, finding non-integrating safer options for reprogramming adult cells became essential, and several methods quickly emerged to transfect cells with the 4 transcription factors such as non-integrative Sendai viral vectors [48], recombinant proteins [49] or synthetic modified mRNAs [50].

Mouse ESCs are easy to obtain and maintain in culture. Therefore, the advantage of working with mouse induced pluripotent stem cells (miPSCs) instead of mESCs for differentiation into hair cells is not crucial, explaining why so little has been done with these cells.

Hair cell differentiation from hSCs

Two different strategies have been developed for generating hair cells from human ES or iPS cells (both called hSCs). While one method relies on the direct induction of otic progenitors from hSCs, the other one involves intermediate stages of NNE and PPR differentiation (Fig. 3).

The induction of otic progenitors directly from hSCs has been achieved with the activation of FGF signalling pathway, reliably giving rise to two kinds of otic progenitors: otic neural progenitors (ONPs) and otic epithelial progenitors (OEPs) [51, 52]. Enrichment of OEPs was performed with sequential dissociation and maintenance in a proliferative medium. OEPs were then derived in cells expressing specific hair cell markers such as *ATOH1*, *BRN3C* and/or *MYO7A* after 2–4 weeks exposure to all-trans retinoic acid (RA) and epidermal growth factor (EGF), two factors previously demonstrated to promote hair cell differentiation in the mammalian cochlea. However, these differentiated cells failed to exhibit stereociliary hair bundles at their apical surface [51, 52], indicating that these factors were not sufficient to drive the full program of hair cell maturation. However, electrophysiologically functional hair cell-like cells were derived from OEPs when co-cultured with chicken utricle stromal cells complemented or not with RA and EGF treatment [52–54], demonstrating that, as for mES cells, chicken utricle stromal cells provide factors required for human hair cell development. Adding a step of PPR induction prior to the otic induction step also gave rise to hair cell-like cells [55]. Unfortunately, the hair cell differentiation efficiency of these protocols remained very low.

Recently, more complex protocols starting with a step of anterior NNE induction have been developed to reproduce/simulate more adequately the normal embryonic developmental stages. As demonstrated for mESC, a medium containing TGF- β and WNT pathway inhibitors allows NNE generation from hESCs [56, 57], but replacing WNT inhibitor by activators of FGF and BMP pathways seems even more efficient [2]. Then, activation of the FGF pathway is necessary to induce PPR fate [2, 56, 57] but high yields of PPR cells necessitate either RA [58] or inhibition of BMP pathway [2]. To progress throughout normal development, transient activation of Wnt signalling is necessary to obtain otic placode precursors. Indeed, starting from competent preplacodal tissue, activated Wnt pathway promotes the generation of otic placode tissue at the expense of the epidermis in embryonic mice [59]. Finally, induction towards hair cells can be actively led by culturing otic placode precursors in 3D [2] while activation of BMP and FGF pathway failed to efficiently trigger full maturation [57] even in combination with Wnt activation [56].

Culturing cells in 3D allowed secretion of undefined factors favouring the differentiation process but also the self-organisation of cells, giving rise to complex vesicles containing hair cell-like cells, which harbour apical kinocilium and stereocilia bundles, as well as neurons expressing synaptic ribbon proteins specific of the mammalian sensory organs. However, derived hair cells exhibited electrophysiological properties typical of vestibular hair cells in accordance with the vestibular morphology of their stereocilia bundles, suggesting that additional signalling modulations are necessary to obtain cochlear hair cells. Taken together, these data prove how delicate the differentiation process is and the fundamental importance of deeply understanding the molecular mechanisms regulating the physiological inner ear development in humans. Indeed, modulating signalling pathways at the wrong time point could dramatically reduce the efficiency of the differentiation into hair cell-like cells [57]. Moreover, single cell analysis throughout the process of hSC monolayer differentiation into posterior placode cells revealed crucial differences between hESCs and hiPSCs cells [56] and even between two different iPS lines, indicating that culture conditions should be adapted to each cell line to promote otic lineage differentiation and finally hair cell-like cells.

Potentials and limitations of stem cells therapies

Replacement therapies relying on stem cells have been successfully led for more than 20 years. Indeed, mesenchymal stem cells (MSC) were first used in 1995 for bone marrow recovery after cancer treatment [60], and they are

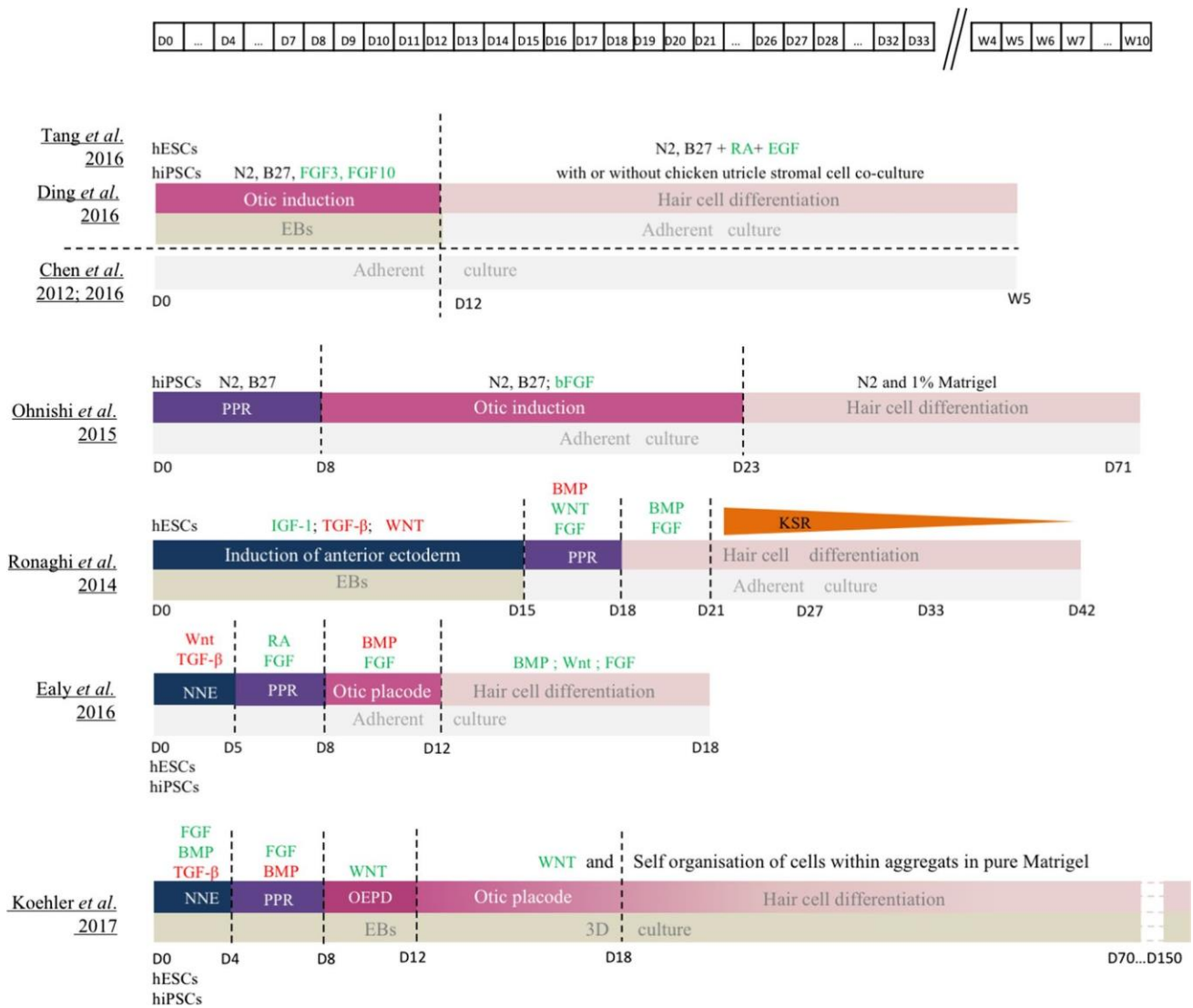


Fig. 3 Comparison of published protocols of human ES and iPSC cell differentiation into hair cell-like cells. *BMP* bone morphogenetic protein, *EB* embryoid bodies, *EGF* epidermal growth factor, *FGF* fibroblast growth factor, *hESCs* human embryonic stem cells, *hiPSCs*

human induced pluripotent stem cells, *IGF-1* insulin-like growth factor 2, *LIF* leukemia inhibitory factor, *NNE* non neural ectoderm, *OEPD* otic epibranchial placode domain, *PPR* pre placodal region, *RA* retinoic acid, *TCF-β* transforming growth factor-β

now routinely used as curative therapy. Moreover, more than 2500 clinical trials involving stem cells have been performed and 644 are still ongoing (<https://clinicaltrials.gov/>), making them attractive for treating many diseases including deafness. In 2015, a clinical trial was conducted to test the effectiveness of autologous bone marrow-derived MSC transplantation in patients with sensorineural hearing loss [61]. Cells were intravenously injected in two patients with no side effects reported 3 years after the injection. Unfortunately, there was no hearing improvement 1, 6 or 12 months later. More recently, injection of autologous umbilical cord stem cells has started for the treatment of acquired hearing loss in 11 children. Audition, but also language development, is recorded for 1 year after the transplantation ([https://](https://clinicaltrials.gov/)

clinicaltrials.gov/). These clinical trials represent the starting point towards stem cell therapy for hearing loss.

For the last 15 years, impressive work has been performed in the field of otic differentiation from both mouse and human SCs. Numerous studies succeeded to obtain functional hair cell-like cells, even if the differentiation efficiency still remains low. However, these derived-hair cell-like cells exhibit a vestibular phenotype, characterised by a distinctive hair bundle at their surface and a typical electrophysiological response [1, 2, 34, 35, 62, 63], suggesting that more investigations have to be pursued to unravel the factors implicated in cochlear hair cell differentiation. Nevertheless, the ability to derive hair cell-like cells from SCs combined with the latest gene editing tool—CRISPR/Cas9 technology—is a new

promising step for treating human hereditary deafness [53, 54]. Indeed, CRISPR/CAS9 system was successfully used to correct deafness-associated mutations in hiPSCs. The stem cell-derived hair cell-like cells that present mutation in *MYO7* or *MYO15* gene harboured defects in stereocilia bundles. The correction of gene mutation using CRISPR/CAS9 technology restored the morphology of hair bundles and the functionality of the derived hair cells [53, 54].

Numerous issues need to be addressed before testing the efficacy of human hair cell-like cell transplantation. First, we need a homogeneous hair-cell like population to avoid transplantation of non-differentiated cells and potential tumour formation [64]. Second, the grafted cells have to be able to integrate into the organ of Corti following their injection. This is not a trivial problem since the compartment of cell injection, the scala media, is filled with endolymph a unique compartment containing a particularly high potassium concentration that may be toxic for injected cells [65–67]. Moreover, if cells survive, they have to reach the damaged portion of the sensory epithelium and correctly integrate into it. Finally, the grafted cells should also establish functional synaptic connections with spiral ganglion neurons.

Many pitfalls have to be surpassed before using hiPSCs as a treatment for hearing loss. The emergence of hiPSCs offered a priceless answer to the ethical considerations of using ES cells and to the immuno-incompatibility of non-autologous transplantations [68]. Unfortunately, significant variability exists between hiPSC lines [69] and consequently developing iPSC lines for each patient is currently too expensive and time-consuming to be conceivable [68]. Nevertheless, in vitro human models are an essential tool for new drug discovery. Indeed, many clinical trials failed because of discrepancies between human and mouse metabolisms. Therefore, human stem cell-derived cultures represent an interesting alternative to animal models.

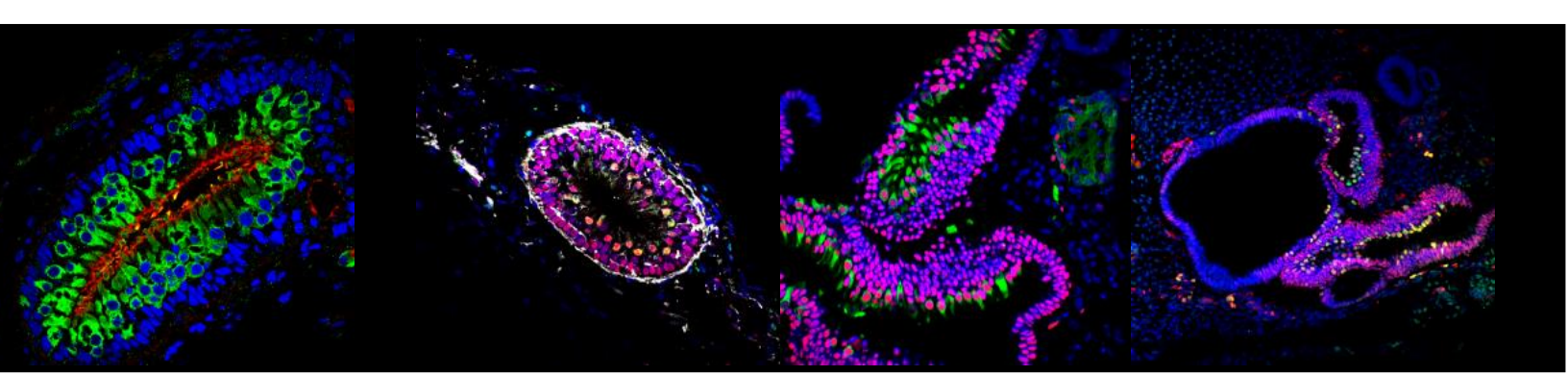
In summary, stem cell therapy has still many challenges to address prior applying it for hearing restoration. However, this field has quickly progressed over the last decade, and promises to make further major strides in the next few years, remaining an ambitious but relevant line of research for hearing loss treatment.

References

- Koehler KR, Mikosz AM, Molosh AI et al (2013) Generation of inner ear sensory epithelia from pluripotent stem cells in 3D culture. *Nature* 500:217–221. <https://doi.org/10.1038/nature12298>
- Koehler KR, Nie J, Longworth-Mills E et al (2017) Generation of inner ear organoids containing functional hair cells from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 35:583–589. <https://doi.org/10.1038/nbt.3840>
- Pieper M, Ahrens K, Rink E et al (2012) Differential distribution of competence for panplacodal and neural crest induction to non-neural and neural ectoderm. *Development* 139:1175–1187. <https://doi.org/10.1242/dev.074468>
- Saint-Jeannet JP, Moody SA (2014) Establishing the pre-placodal region and breaking it into placodes with distinct identities. *Dev Biol* 389:13–27. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.02.011>
- Basch ML, Brown RM, Jen HI, Groves AK (2016) Where hearing starts: the development of the mammalian cochlea. *J Anat* 228:233–254. <https://doi.org/10.1111/joa.12314>
- Freter S, Muta Y, Mak S-S et al (2008) Progressive restriction of otic fate: the role of FGF and Wnt in resolving inner ear potential. *Development* 135:3415–3424. <https://doi.org/10.1242/dev.026674>
- Hidalgo-Sánchez M, Alvarado-Mallart R, Alvarez IS (2000) Pax2, Otx2, Gbx2 and Fgf8 expression in early otic vesicle development. *Mech Dev* 95(1–2):225–9
- Kelley MW (2006) Regulation of cell fate in the sensory epithelia of the inner ear. *Nat Rev Neurosci* 7:837–849. <https://doi.org/10.1038/nrn1987>
- Fekete DM, Muthukumar S, Karagogeos D (1998) Hair cells and supporting cells share a common progenitor in the avian inner ear. *J Neurosci* 18:7811–7821
- Laine H, Sulg M, Kirjavainen A, Pirvola U (2010) Cell cycle regulation in the inner ear sensory epithelia: role of cyclin D1 and cyclin-dependent kinase inhibitors. *Dev Biol* 337:134–146. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.027>
- Oesterle EC, Campbell S, Taylor RR et al (2008) Sox2 and Jagged1 expression in normal and drug-damaged adult mouse inner ear. *JARO* 9:65–89. <https://doi.org/10.1007/s10162-007-0106-7>
- Wu DK, Kelley MW (2012) Molecular mechanisms of inner ear development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a008409. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008409>
- Lanford PJ, Lan Y, Jiang R et al (1999) Notch signalling pathway mediates hair cell development in mammalian cochlea. *Nat Genet* 21:289–292. <https://doi.org/10.1038/6804>
- Lee S, Jeong H-S, Cho H-H (2017) Atoh1 as a coordinator of sensory hair cell development and regeneration in the cochlea. *Chonnam Med J Chonnam Med J* 53:37–46. <https://doi.org/10.4068/cmj.2017.53.1.37>
- White PM, Doetzlhofer A, Lee YS et al (2006) Mammalian cochlear supporting cells can divide and trans-differentiate into hair cells. *Nature* 441:984–987. <https://doi.org/10.1038/nature04849>
- Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154–156. <https://doi.org/10.1038/292154a0>
- Smith AG, Heath JK, Donaldson DD et al (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336:688–690. <https://doi.org/10.1038/336688a0>
- Williams RL, Hilton DJ, Pease S et al (1988) Myeloid leukemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336:684–687. <https://doi.org/10.1038/336684a0>
- Sato N, Meijer L, Skaltsounis L et al (2004) Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 10:55–63. <https://doi.org/10.1038/nm979>
- Bain J, Plater L, Elliott M et al (2007) The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J* 408:297–315. <https://doi.org/10.1042/BJ20070797>
- Habibi E, Brinkman AB, Arand J et al (2013) Whole-genome bisulfite sequencing of two distinct interconvertible DNA methylomes of mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 13:360–369
- Leitch HG, McEwen KR, Turp A et al (2013) Naive pluripotency is associated with global DNA hypomethylation. *Nat Struct Mol Biol* 20:311–316. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2510>

23. Marks H, Kalkan T, Menafra R et al (2012) The transcriptional and epigenomic foundations of ground state pluripotency. *Cell* 149:590–604. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.026>
24. Boroviak T, Loos R, Lombard P et al (2015) Lineage-specific profiling delineates the emergence and progression of naive pluripotency in mammalian embryogenesis. *Dev Cell* 35:366–382. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.10.011>
25. Joshi O, Wang SY, Kuznetsova T et al (2015) Dynamic reorganization of extremely long-range promoter-promoter interactions between two states of pluripotency. *Cell Stem Cell* 17:748–757. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.11.010>
26. Martin Gonzalez J, Morgani SM, Bone RA et al (2016) Embryonic stem cell culture conditions support distinct states associated with different developmental stages and potency. *Stem Cell Reports* 7:177–191. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.07.009>
27. Choi J, Huebner J, Clement K et al (2017) Prolonged Mek1/2 suppression impairs the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 548(7666):219–223. <https://doi.org/10.1038/nature23274>
28. Li H, Roblin G, Liu H, Heller S (2003) Generation of hair cells by stepwise differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13495–13500. <https://doi.org/10.1073/pnas.2334503100>
29. Uji Y, Sakagami M, Omori H et al (2017) Efficient induction of inner ear hair cell-like cells from mouse ES cells using combination of Math1 transfection and conditioned medium from ST2 stromal cells. *Stem Cell Res* 23:50–56. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.06.013>
30. Uji Y, Ishizaka S, Nakamura-Uchiyama F, Yoshikawa M (2012) In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells into inner ear hair cell-like cells using stromal cell conditioned medium. *Cell Death Dis* 3:e314. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.56>
31. Taura A, Ohnishi H, Ochi S et al (2014) Effects of mouse utricle stromal tissues on hair cell induction from induced pluripotent stem cells. *BMC Neurosci* 15:121. <https://doi.org/10.1186/s12868-014-0121-7>
32. Oshima K, Shin K, Diensthuber M et al (2010) Mechanosensitive hair cell-like cells from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell* 141:704–716. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.035>
33. Yoshikawa M, Uji Y (2016) Induction of inner ear hair cells from mouse embryonic stem cells in vitro. *Methods Mol Biol.* 1516:257–267. https://doi.org/10.1007/7651_2016_328
34. Longworth-Mills E, Koehler KR, Hashino E (2016) Generating inner ear organoids from mouse embryonic stem cells. *Methods Mol Biol.* 1341:391–406. https://doi.org/10.1007/7651_2015_215
35. Koehler KR, Hashino E (2014) 3D mouse embryonic stem cell culture for generating inner ear organoids. *Nat Protoc* 9:1229–1244. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.100>
36. Abboud N, Fontbonne A, Watabe I et al (2016) Culture conditions have an impact on the maturation of traceable, transplantable mouse embryonic stem cell-derived otic progenitor cells. *J Tissue Eng Regen Med*
37. Martignoni M, Groothuis GMM, de Kanter R (2006) Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2:875–894. <https://doi.org/10.1517/17425255.2.6.875>
38. Uhl EW, Warner NJ (2015) Mouse models as predictors of human responses: evolutionary medicine. *Curr Pathobiol Rep* 3:219–223. <https://doi.org/10.1007/s40139-015-0086-y>
39. Mestas J, Hughes CCW (2004) Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 172:2731–2738. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.172.5.2731>
40. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145–1147
41. Thomson JA, Itskovitz-eldor J, Shapiro SS et al (2007) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* (80-) 1145:. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
42. Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
43. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M et al (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
44. Boyer LA, Lee TI, Cole MF et al (2005) Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122:947–956. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.020>
45. Loh Y-H, Wu Q, Chew J-L et al (2006) The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 38:431–440. <https://doi.org/10.1038/ng1760>
46. Fernandez PC, Frank SR, Wang L et al (2003) Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes Dev* 17:1115–1129. <https://doi.org/10.1101/gad.1067003>
47. Peng T, Dong Y, Zhu G, Xie D (2014) Induced pluripotent stem cells: landscape for studying and treating hereditary hearing loss. *J Otol* 9:151–155. <https://doi.org/10.1016/j.joto.2015.02.001>
48. Fusaki N, Ban H, Nishiyama A et al (2009) Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85:348–362
49. Kim D, Kim C-H, Moon J-I et al (2009) Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4:472–476. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.005>
50. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T et al (2010) Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7:618–630. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.012>
51. Chen W, Jongkamonwiwat N, Abbas L et al (2012) Restoration of auditory evoked responses by human ES-cell-derived otic progenitors. *Nature* 490:278–282. <https://doi.org/10.1038/nature11415>
52. Ding J, Tang Z, Chen J et al (2016) Induction of differentiation of human embryonic stem cells into functional hair-cell-like cells in the absence of stromal cells. *Int J Biochem Cell Biol* 81:208–222. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.11.012>
53. Tang Z-H, Chen J-R, Zheng J et al (2016) Genetic correction of induced pluripotent stem cells from a deaf patient with MYO7A mutation results in morphologic and functional recovery of the derived hair cell-like cells. *Stem Cells Transl Med* 5:561–571. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0252>
54. Chen J-R, Tang Z-H, Zheng J et al (2016) Effects of genetic correction on the differentiation of hair cell-like cells from iPSCs with MYO15A mutation. *Cell Death Differ* 23:1347–1357. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.16>
55. Ohnishi H, Skerleva D, Kitajiri S et al (2015) Limited hair cell induction from human induced pluripotent stem cells using a simple stepwise method. *Neurosci Lett* 599:49–54. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.05.032>
56. Ealy M, Ellwanger DC, Kosaric N et al (2016) Single-cell analysis delineates a trajectory toward the human early otic lineage. *Proc Natl Acad Sci* 113:8508–8513. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605537113>
57. Ronaghi M, Nasr M, Ealy M et al (2014) Inner ear hair cell-like cells from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 23:1275–1284. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0033>

58. Ealy M, Ellwanger DC, Kosaric N et al (2016) Single-cell analysis delineates a trajectory toward the human early otic lineage. *Proc Natl Acad Sci* 113:201605537. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605537113>
59. Ohyama T, Mohamed OA, Taketo MM et al (2006) Wnt signals mediate a fate decision between otic placode and epidermis. *Development* 133:865–875. <https://doi.org/10.1242/dev.02271>
60. Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL et al (1995) Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transpl* 16:557–564
61. Lee HS, Kim WJ, Gong JS, Park KH (2018) Clinical safety and efficacy of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in sensorineural hearing loss patients. *J Audiol Otol* 22:105–109. <https://doi.org/10.7874/jao.2017.00150>
62. Nie J, Koehler KR, Hashino E (2017) Directed differentiation of mouse embryonic stem cells into inner ear sensory epithelia in 3D culture. *Methods Mol Biol* 1597:67–83. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6949-4_6
- Liu X-P, Koehler KR, Mikosz AM et al (2016) Functional development of mechanosensitive hair cells in stem cell-derived organoids parallels native vestibular hair cells. *Nat Commun* 7:11508. <https://doi.org/10.1038/ncomms11508>
63. Lee AS, Tang C, Rao MS et al (2013) Tumorigenicity as a clinical hurdle for pluripotent stem cell therapies. *Nat Med*. <https://doi.org/10.1038/nm.3267>
64. Okano T, Kelley MW (2012) Stem cell therapy for the inner ear. *Trends Amplif* 16:4–18. <https://doi.org/10.1177/1084713812440336>
65. Hu Z, Ulfendahl M (2013) The potential of stem cells for the restoration of auditory function in humans. *Regen Med* 8:309–318. <https://doi.org/10.2217/rme.13.32>
66. Kürşat Gökcan M, Mülazimoğlu S, Ocak E et al (2016) Turkish journal of medical sciences study of mouse induced pluripotent stem cell transplantation into Wistar albino rat cochleae after hair cell damage. *Turk J Med Sci* 46:1603–1610. <https://doi.org/10.3906/sag-1510-136>
67. Pauley S, Kopecky B, Beisel K et al (2008) Stem cells and molecular strategies to restore hearing. *Panminerva Med* 50:41–53
68. Ortmann D, Vallier L, Wang J, Esteban M (2017) Variability of human pluripotent stem cell lines This review comes from a themed issue on Cell reprogramming. *Curr Opin Genet Dev* 46:179–185. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.07.004>



La surdité est un problème de santé majeur qui touche une proportion toujours grandissante de la population mondiale. Ces pertes auditives résultent majoritairement de dommages causés aux cellules ciliées, impliquées dans la détection du son, ou de leurs neurones afférents présents au sein de l'oreille interne. Ces dommages sont irréversibles puisque ces cellules otiques sont incapables de régénérer. Parmi les facteurs en cause, la génétique joue un rôle prépondérant dans le développement des surdités neurosensorielles. Si de nombreux modèles murins existent, la translation à l'Homme des connaissances ainsi acquises n'est pas toujours efficace, et il est donc primordial de développer des modèles d'études humains éthiquement acceptables. Au cours de ce travail, nous avons utilisé les hiPSCs et leur différenciation en cellules ciliées de l'oreille interne afin d'étudier deux cas de surdités génétiques. Le premier est associé au syndrome d'Alström, une pathologie rare résultant de la mutation récessive du gène *ALMS1*. Les patients développent de nombreux symptômes d'intensité variable parmi lesquels l'obésité, le diabète de type II, une cardiomyopathie dilatée, des troubles rénaux et hépatiques, une rétinopathie et une surdité neurosensorielle bilatérale progressive. Le second gène étudié est le gène *CDK5RAP2*, dont la mutation mène à une forme de microcéphalie héréditaire primaire (MCPH) suite à la division asymétrique précoce des progéniteurs neuronaux. Bien que leurs mutations entraînent des phénotypes drastiquement différents, ces deux protéines essentielles à la fonction auditive sont exprimées au sein d'une même structure : le centrosome/corps basal des cellules.

Au cours de ce travail, nous avons dans un premier temps confirmé l'expression centrosomale d'*ALMS1* et de *CDK5RAP2* dans les fibroblastes humains, les hiPSCs et les progéniteurs otiques dérivés de ces hiPSCs. Nous avons également noté des anomalies du centrosome lorsqu'*ALMS1* ou *CDK5RAP2* est muté. Ainsi, la mutation d'*ALMS1* mène à un accroissement de la distance intercentriolaire corrélée à une réduction du marquage centrosomal de CNAP-1. La mutation de *CDK5RAP2* aboutit également à une réduction du signal de CNAP-1 mais cette fois sans affecter la distance entre les centrioles. Ces résultats suggèrent que la protéine *ALMS1* ancre CNAP-1 aux extrémités des centrioles et que, lorsqu'elle est mutée, trop peu de CNAP-1 est fixé à ces structures, entraînant un affaiblissement du lien intercentriolaire. Le lien entre les protéines *CDK5RAP2* et CNAP1 est moins clair. *CDK5RAP2* pourrait être impliquée dans le recrutement, la stabilisation ou la modulation des partenaires de CNAP-1. Son absence induit également une réduction significative des niveaux de γ -TUBULINE dans les fibroblastes *CDK5RAP2*, ainsi que des cassures dans la plaque équatoriale des hiPSCs en mitose. Cependant, les cellules *CDK5RAP2* sont capables de former des fuseaux mitotiques et de se diviser. Ces résultats combinés à ceux disponibles dans la littérature actuelle suggèrent que *CDK5RAP2* est important pour l'axe de division. Finalement, un modèle de différenciation 3D des hiPSCs en cellules otiques nous a permis de conclure que les mutations d'*ALMS1* et de *CDK5RAP2* n'impactent pas le développement de progéniteurs otiques. Certaines de ces dernières se différencient ensuite en cellules exprimant *POU4F3*, un marqueur précoce de cellules ciliées. Nous avons également pu observer dans les organoïdes *ALMS1* la présence de cellules ciliées plus matures arborant à leur surface apicale une touffe stéréociliaire, ce qui est en accord avec l'apparition post-natale des surdités chez les patients atteints du syndrome d'Alström. Il est maintenant primordial de s'intéresser à la maintenance de ces cellules ciliées en réalisant des cultures à très long terme, ce qui peut être facilité par l'utilisation d'un bioréacteur. Notons que ces cellules ciliées plus matures n'ont jamais été observées dans les organoïdes *CDK5RAP2*, bien que le patient entende à la naissance. Ce résultat suggère qu'il existe, dans ce cas précis, un biais de notre modèle d'étude et qu'un mécanisme compensatoire est présent au cours du développement embryonnaire.