



Université de Liège - Faculté de Médecine

Laboratoire de Neurobiologie du développement

Professeur Brigitte Malgrange

**Utilisation des cellules souches à pluripotence
induite humaines normale et mutante pour
l'étude et le traitement des surdités génétiques**

Benjamin Grobarczyk

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences
biomédicales et pharmaceutiques

Année Académique 2015 - 2016

© *Illustration de couverture : Stephen Dixon.*

**Utilisation des cellules souches à pluripotence
induite humaines normale et mutante pour
l'étude et le traitement des surdités
génétiques**

Résumé du travail

Chez l'homme, la perte de cellules cochléaires est irréversible et conduit à la surdité neurosensorielle. Le syndrome d'Alström (ALMS) est une maladie génétique, autosomale récessive, caractérisée par de nombreux symptômes dont la surdité. La protéine mutée ALMS1 est responsable de la maladie et cette protéine est exprimée au niveau du centrosome des cellules en prolifération et au corps basal des cellules ciliées et de soutien. Pour développer un modèle cellulaire le plus proche de la pathologie humaine, notre projet est basé sur l'utilisation de cellules souches humaines à pluripotence induite (hiPS) normales ou mutantes. Nous avons généré pour la première fois des hiPS ALMS à partir de fibroblastes de patient ALMS sourds. Les propriétés essentielles d'auto-renouvellement et de pluripotence de ces cellules ont été validées.

Récemment, il a été démontré que les cellules souches embryonnaires humaines (hES) et murines (mES) peuvent se différencier *in vitro* en cellules cochléaires. A partir de cellules hiPS saines, nous avons développé un protocole de différenciation et obtenu en une population homogène de cellules ayant un patron d'expression protéique et géniques correspondant à celui des progéniteurs otiques (hOSCs). Lorsque ces cellules sont cultivées en présence de cellules nourricières, les hOSCs sont capables de générer des cellules ciliées. Nous avons appliqué le protocole de différenciation aux hiPS ALMS et observé des défauts de prolifération et de cycle cellulaire aux différents stades de différenciation (hiPS, hOSCs et après différenciation).

Les résultats obtenus à partir des cellules ALMS différenciées suggèrent que leur potentiel de différenciation en cellules ciliées n'est pas affecté comme suggéré par Jagger *et al.* et Nodal *et al.* Cependant, les cellules hOSCs ALMS développe un cil primaire plus court. Nous avons également observé des défauts de proliférations et de cycle cellulaire entre cellules saines et mutées à différents stade de différenciation. Nous avons également remarqué une diminution de cohésion des centrosomes dans les cellules ALMS qui pourrait expliquer la diminution de prolifération et l'arrêt en G1 des hOSCs mutées. Nous émettons l'hypothèse que les progéniteurs otiques mutés entrent en sénescence et qu'un nombre réduit de cellules ciliées se développent correctement. Ces hypothèses permettraient d'expliquer la surdité précoce des patients ALMS.

Enfin, pour exclure les biais de différenciation dus à l'origine différentes des cellules hiPS saine et pathologique, nous voulons corriger la mutation présente dans les hiPS par la technique de l'édition du génome (CRISPR/CAS). La génération d'une lignée isogénique à partir d'hiPS ALMS nous permettra de confirmer les phénotypes observés et de les relier à la mutation de la protéine ALMS1. A terme, la génération de la lignée isogénique nous fournira un modèle humain et inépuisable pour l'étude plus approfondie du syndrome d'Alström.

**Derivation of cochlear cells from pathological
or isogenic human iPSCs for modeling
hereditary hearing loss**

Abstract

Alström Syndrome (ALMS) is a human, autosomal recessive, genetic disorder characterized by numerous clinical symptoms including deafness. ALMS is caused by mutations in the *ALMS1* gene encoding a protein located at the basal body, which seems to be implicated in ciliogenesis, cell cycle and proliferation. Knowing that *ALMS1* is expressed in the inner ear, we are interested in understanding the unknown mechanisms involving this protein in the genetic deafness in ALMS patients. To do so, we developed a model closer to the human pathology, by using human induced pluripotent stem cells (hiPS) generated from healthy and ALMS patients.

Recently it was demonstrated that mouse and human embryonic stem cells can be directed to an otic fate. Using a stepwise protocol, we demonstrate that healthy hiPS cells can generate a homogenous population of cells with a gene and protein expression profile consistent to the ones of otic progenitor cells (hOSCs). When co-cultured with mouse feeder cells, human hOSCs are then able to differentiate into hair cells (HCs). We successfully applied our differentiation protocol to ALMS hiPS cells, these helped us in better understanding multiple aspects known to be related to ALMS (f.e. ciliogenesis and proliferation).

Results obtained from the differentiation of AS hiPSCs into HCs suggest that the differentiation potential of these cells into cochlear cells is unaffected in AS patients as suggested by Jagger *et al.* and Nodal *et al.* However, the hOSCs ALMS cells display a shorter primary cilium. We also observed some proliferation and cell cycle defects between healthy and ALMS cells at different stages of the differentiation protocol. We noticed an increased centrosomal distance in ALMS cells together with a decreased proliferation and a G1 arrest in the ALMS hOSCs. We hypothesize that mutated progenitor cells enter in senescence suggesting that a reduced number of hair cells develop correctly. Together, these results may explain the early onset of hearing loss in ALMS patients.

To exclude patients linked epigenetics and differentiation defects, we want to correct the genomic mutation in the ALMS hiPS cells to generate isogenic hiPS cells using the CRIPSR/Cas9 system. Thanks to isogenic hiPS cells we'll be able to confirm that these defects are well due to the *ALMS1* mutation. Moreover, these ALMS hiPS cells and their related isogenic hiPS cells will furthermore create an avenue to other studies that envisage understanding other ALMS pathological symptoms.

A mes parents, ma sœur et mon frère,

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Philippe Lefèbre, Luc Willems, Denis Mottet et Laurent Nguyen pour m'avoir suivi tout au long de ma thèse, pour vos remarques pertinentes lors de nos réunions de comité et pour avoir pris le temps de lire ce manuscrit. Je tiens également à remercier Cécile Martinat et Eve Seuntjens pour s'être intéressées à mon travail et d'avoir accepté de l'évaluer.

Tous mes travaux ont été financés par le FNRS/F.R.I.A et ont également bénéficié du soutien du Fond Léon Frédéricq de l'Université de Liège.

Mes plus importants remerciements vont évidemment à Brigitte Malgrange dit « b ». Merci de m'avoir fait confiance depuis le début de mon arrivée et ma première PCR de génotypage jusqu'à l'aboutissement de ce manuscrit. Merci également de m'avoir permis de travailler sur ces technologies de pointes que sont les hiPS et le CRISPR. Merci pour votre disponibilité même dans les moments les plus stressants. Ces six années dans votre équipe ont été pour moi extrêmement enrichissantes scientifiquement, humainement et sportivement. Grâce à votre dynamisme et votre enthousiasme, vous avez le don de motiver et pousser les gens vers l'avant (surtout les jours de lendemains difficiles). D'ailleurs, j'espère continuer la course à pied et un jour bien entendu vous lancer un gros « COLLE !!! ». Enfin, merci d'avoir toujours répondu présente pour toutes les soirées, repas, et autres organisations « team-building ».

Merci à la fabuleuse, superbe, wonderful, toujours souriante sauf quand ça va pas...mais quand il y a de la bouffe, ça reva..ma très chère Laulau ! Merci tout d'abord de m'avoir initié non sans mal, à la culture de cellule souche. Merci pour toutes les fois où tu as pris sur toi (et que ça ne se voyait pas). Au fil des années tu es passée de collègue à véritable amie. Rien n'aurait été pareil sans toi et ton dynamisme légendaire. Je te remercie du fond du cœur pour toutes nos discussions scientifiques et autres maintenant grâce à toi je connais à fond la biologie marine et David Guetta.

Je tiens à remercier Kévin, Keke, le ptit dernier...qu'on aime bien ennuyer mais pas trop. Plus sérieusement, merci à toi d'avoir assuré depuis ton arrivée jusqu'à la fin de ma thèse. Je compte sur toi et ton talent d'organisateur pour perpétuer la tradition du vendredi au labo. Merci pour tout, mais pas pour m'avoir fait découvrir l'aller simple. Ton 48 restera légendaire.

Merci à toi aussi LOL pour tous tes conseils quand je galérais en biomol. Encore bien que tu étais là merci beaucoup ! Je tenais également à te remercier personnellement pour tous les scoops que tu as partagés dans le bureau.

Merci à vous les amis, maman et papa Tuch'. Même si on ne fait pas partie de la même famille, merci pour votre disponibilité, votre aide et votre gentillesse tant au labo qu'en dehors. Béné, merci pour nos discussions lors de nos nombreuses collaborations scientifiques mais surtout et

aussi pour nos folles soirées. PB, merci aussi pour toutes les dissections et toutes les horribles choses que tu as du faire pour moi. J'espère qu'un jour ils feront une route correcte jusqu'à chez toi pour que je puisse te rendre visite. D'ici-là, essaie de ne pas trop grossir.

Jess et Lari, mes machines, merci à vous pour tous les petits (mais nombreux) services que vous m'avez rendus. Vous avoir comme amies est une des choses que je garderai en partant (avec quelques bics, post-it et indélébiles de la réserve)! Merci d'avoir partagé avec moi la moitié de ma thèse à la machine à café. Maintenant, je connais toutes les nuances de vernis. Merci pour vos conseils avisés d'achat cadeau, merci aussi pour ces descentes en ville éclairées en moins de 4h. Ma couille, merci pour la relecture de mon intro. Vous allez me manquer !

Merci à toi Ren, dit « fils » ou « chef ». Merci pour tes éclaircissements scientifiques et pour ta gentillesse. Bon courage au foot, si un jour tu craques, sonne-moi.

Merci à toi Sandrouch ! Merci à toi Cath ! Thank you Steve and enjoy my desk ! Merci à toi Quentin! Dank u wel Eve and veel geluk !

Merci à toi, Pri les nombreuses fois où tu as répondu présente pour moi, pour tout le temps que tu as consacré à répondre à mes questions administratives et autres recherches d'anticorps.

Ola que tal ! Merci à toi Suzi ! Usted es el siguiente...

Merci à vous, Guérin et Geldnon pour les moments passés ensemble !

Je tiens également à remercier les membres de l'équipe des bleus et des jaunes pour leurs conseils et idées, le temps qu'ils ont pris pour moi, sur l'utilisation d'un appareillage ou tout simplement discuter de l'avancement du projet : Amandine C, Amandine D, Carla, Elise, PPP, Martin, Nath K!

Merci également à Nespresso sans qui je serais certainement décédé au cours de cette année.

Au détour des couloirs GIGA-Neuro, ou à la paillasse (ou sur le balcon), j'ai également eu la chance de rencontrer de formidables personnes (surtout sur le balcon) : Merci à vous pour tous ces bons moments !!

Je souhaiterais également remercier ma famille, Maman, Papa, So, Piet, Piou, Moni, Lou et mon Clem qui m'ont supporté (malgré leur très jeune âge pour certains) tout au long de mon parcours. Merci d'avoir traversé ensemble tant d'épreuves et d'être toujours là quand j'ai besoin de vous. Vous êtes une famille en or à mes yeux.

Je terminerai ces remerciements, par remercier mon petit cœur, titi, la meilleure. Je t'ai rencontrée au labo et c'est la plus des plus belle chose qui me soit arrivée depuis longtemps. Merci d'être comme tu es et d'être là pour moi. Je souhaite que tous nos projets se réalisent et pouvoir lire le bonheur encore longtemps dans tes yeux car c'est quelque chose de merveilleux.

TABLE DES MATIERES

RESUME DU TRAVAIL	14
LISTE DES ABRÉVIATIONS	15
INTRODUCTION	19
1. Les cellules souches embryonnaires humaines (hES)	19
1.1 Le développement embryonnaire précoce	19
1.2 Découverte et origine des mES	19
1.3 Découverte et origine des hES	21
1.4 Propriétés des hES	21
1.4.1 Morphologie	21
1.4.2 Caryotype	22
1.4.3 Activité télomérase	22
1.4.4 Expression de marqueurs moléculaires spécifiques	23
1.4.5 Pluripotence	23
– Ectoderme	23
– Mésoderme	25
– Endoderme	26
1.4.6 Auto-renouvellement	27
– Voies intrinsèques	27
– Voies extrinsèques	31
2. Les cellules souches humaines à pluripotence induite (hiPS)	38
2.1 La découverte et l'origine de la reprogrammation	38
– Reprogrammation naturelle	38
– Reprogrammation induite	40
2.2 Systèmes de délivrance des gènes dans la cellule	43
2.3 Le processus de la reprogrammation	46
2.4 Propriétés des cellules hiPS	50
2.5 Challenges et applications thérapeutiques	51
2.5.1 Cellules hiPS et essais précliniques	52
2.5.2 Cellules hiPS et médecine régénérative	53
3. L'édition du génome ou genome editing	54
3.1 Les techniques d'édition du génome	55
3.2 Cas particulier de la technique CRISPR/CAS9	56
3.3 Spécificité et « off-targets »	59
3.4 CAS9 nickase	60
3.5 Applications dans la modélisation de pathologies	61
4. L'oreille interne	62
4.1 Développement précoce	63
4.2 Développement du ganglion spiral	66
4.3 Différenciation des cellules de l'organe de Corti	67

4.3.1	Cellules ciliées	67
4.3.2	Cellules de soutien	70
5.	Différenciation des cellules ES ou iPS en cellules de l'oreille interne	71
5.1	Chez la souris	71
5.2	Chez l'homme	75
5.3	Limitations	77
6.	Les surdités	77
6.1	Etiologie	77
6.2	Le Syndrome d'Alström	78
6.2.1	Génétique du syndrome d'Alström	78
6.2.2	Mécanismes moléculaires impliqués	80
6.2.3	Rôles d'ALMS1 dans la ciliogenèse	80
6.2.4	Rôle d'ALMS1 dans le contrôle du cycle cellulaire	81
6.2.5	Rôle d'ALMS1 dans la différenciation cellulaire	82
	BUT DU TRAVAIL	85
	MATÉRIELS ET MÉTHODE	87
1.	Génération des cellules hiPS	87
2.	Culture des cellules hiPS	88
3.	Différenciation spontanée en 3 feuillets embryonnaires	88
4.	Génération de tératome	89
5.	Caryotype	89
6.	Différenciation	89
	– Génération d'EB et induction otique	89
	– Maintenance des progéniteurs otiques	90
	– Différenciation en cellules cochléaires	90
7.	RT-PCR quantitative	91
8.	Immunomarquages	92
9.	Marquage au FM1-43	93
10.	Cycle cellulaire et prolifération	94
11.	Mort par apoptose	95
12.	Longueur du cil primaire	95
		12

13. Edition du génome des cellules hiPS par CRISPR/Cas9	95
RÉSULTATS	99
1. Génération et caractérisation d'hiPSCs mutées dérivées de patients atteints de surdité génétique	99
2. Correction de la mutation des lignées hiPSCs mutées par « genome editing »	106
2.1 Construction et validation fonctionnelle du CRISPR/Cas9	106
2.2 Correction de la mutation ponctuelle des cellules hiPS ALMS	109
2.3 Validation des cellules hiPS isogénique corrigées	112
3. Différenciation des hiPSCs WT en cellules cochléaires	114
3.1 Induction de progéniteurs otiques	115
3.2 Différenciation terminale en cellules cochléaires	121
4. Modélisation et étude de la pathologie humaine	124
4.1 Etude des capacités de différenciation des cellules hiPS mutées en cellules cochléaires	124
4.2 Etude de la prolifération aux différents stades de différenciation	128
4.3 Etude de la ciliogenèse	134
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	137
1. Les cellules hiPS WT se différencient en une population homogène de progéniteurs otiques	137
2. Les cellules hOSCs forment des rosettes otiques après 10 jours de différenciation	140
3. Génération d'hiPS ALMS à partir de fibroblastes d'un patient sourd atteint du syndrome d'Alström	142
4. Les cellules hiPS ALMS semblent se différencier correctement en hOSCs puis en cellules ciliées mutées	142
5. Perturbation du cycle cellulaire dans les cellules mutées pour ALMS1	144
6. Perturbation de la ciliogenèse dans les cellules mutées pour ALMS1	148
7. Les cellules différenciées mutées pour ALMS1 semblent ré-entrer en cycle cellulaire	151
CONCLUSION	154
BIBLIOGRAPHIE	157
TABLES DES FIGURES	193
LISTE DES TABLEAUX	195

LISTE DES ABBREVIATIONS

Liste des abréviations

5AZA: 5-azacytidine

A

ADN: acide désoxyribonucléique
 ALK : activin receptor-like kinase
 ALMS : Alström Syndrome
 ALMS1 : Alström Syndrome protein 1
 APC :
 ARN : acide ribonucléique
 ARNg : ARN guide
 ARNm : ARN messenger
 AS : Alström Syndrome
 ATOH1 : Atonal bHLH Transcription factor Homolog 1

B

BAC : bacterial artificial chromosome
 BCL2-L11: B-cell lymphoma 2-like 11
 bHLH : boucle helix loop helix
 BMP4 : bone morphogenic protein

C

CAS9 : CRISPR associated endonuclease 9
 CCE: cellule ciliée externe
 CCI: cellule ciliée interne
 CDB: cassure double brin
 CDH : cadherin
 CDK : cyclin dependant kinase
 CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

D

DDR : DNA damage response
 DFNA : nonsyndromic deafness, autosomal dominant
 DFNB : nonsyndromic deafness, autosomal recessive
 DKK : dickkopf
 DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
 DSB : double-stranded break

E

E : embryonic day
 EB : embryoid body
 ECM : extracellular matrix component
 EpCAM : Epithelial cell adhesion molecule
 EPI : épiblaste
 ERC : endosomal recycling component
 ESRRB : Estrogen-Related Receptor Beta
 EYA : eyes absent

F

FD : familial dysautonomia
 FGF: fibroblast growth factor
 FGFR: fibroblast growth factor receptor
 FIV: fécondation in vitro
 FRAT2 : Frequently Rearranged In Advanced T-Cell Lymphomas 2
 FRS2 : Fibroblast Growth Factor Receptor Substrate 2

G

GAP : GTPase-Activating Protein
 GDP : guanosine diphosphate
 GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor
 GLUT4 : Glucose transporter type 4
 GMP : Good Manufacturing Practices
 GRB2 : Growth factor receptor-bound protein 2
 GSK3beta : Glycogen synthase kinase-3 beta
 GTP : guanosine triphosphate

H

HBH : helix boucle helix
 HD : Huntington disease
 HDAC : histone désacétylase
 HDR : Homology Directed Repair
 hERG : human Ether-à-go-go-Related Gene
 hES : human embryonic stem cell
 HES : Hairy and Enhancer-of-Split

HEY : Hes-Related Family BHLH
Transcription Factor with YRPW
Motif 1

hiPS : human induced pluripotent stem cell

HMG : high mobility group

HS: héparine sulfate

I

ICM : inner cell mass

IF: immunofluorescence

IHC : inner hair cell

IKBKAP : inhibitor of kappa light
polypeptide gene enhancer in B-
cells, kinase complex-associated
protein

IL : interleukin

INDELS: insertion/deletions

J

JAG2 : Jagged 2

K

KCNH2 : Potassium Channel, Voltage Gated
Eag Related Subfamily H, Member
2

KDa: kiloDalton

KI : knock-in

KLF : kruppel like factor

KO : knock-out

Kpb: kilo de paires de bases

L

LBX1 : Ladybird Homeobox 1

LEFTY: left-right determination factor

LIF: leukemia inhibitor factor

LIN28a : lin-28 homolog a

LQT : long QT

M

MEF: mouse embryonic fibroblast

mEpiSC: mouse epiblast-derived stem cell

mES: mouse embryonic stem cell

MET: mesenchyme to épithélial transition

miARN: micro ARN

miPS: mouse induced pluripotent stem cell

MP: membrane plasmique

MYC: myelocytomatosis oncogene

MYF5 : Myogenic Factor 5

N

N: nucléotide

NEUROG1: Neurogenin-1

NHEJ: non homologous end joining

NICD: NOTCH receptor intracellular
domain

O

OC: organ de Corti

OCT : octamer-binding transcription factor

OEPD: otic-epibranchial placodal domain

OHC: outer hair cell

OMS: organisation mondiale de la santé

ONECUT1 : One Cut Homeobox 1

OS: OCT4/SOX2

OSK: OCT4/SOX2/KLF4

OSKM: OCT4/ SOX2/KLF4/cMYC

OT: off target

P

PAM: protospacer adjacent motif

PAX6: paired box

PB: paire de base

PBS: phosphate-buffered saline

PE : primitive endoderme

PKC : Protein Kinase C

PLCY Phospholipase C

POU5F1: POU domain, class 5, transcription
factor 1

PPR : preplacodal region

pRB : phospho-Retinoblastoma

PROX1: Prospero Homeobox 1

PRPH: peripherin

Q

qRT-PCR: quantitative Real Time
Polymerase Chain Reaction

R

RA: retinoic acid

ROCK: Rho-associated protein kinase

ROCKI: ROCK inhibitor

ROS: reactive oxygen species

S

SALL4: Spalt-Like Transcription Factor 4

SC: supporting cell

SCNT : somatic cell nuclear transfer

SeV : Sendai Virus

SG : Spiral Ganglion

SGN : Spiral Ganglion Neuron

SHH : Sonic Hedgehog

siRNA : small inhibitory RNA

SIX : sine oculis homeobox homolog 1

SLA: sclérose latérale amyotrophique

SNC: système nerveux central

SOX2: Sex determining Region Y box 2

SSEA-3 : Stage specific embryonic antigen 3

STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3

T

T7E1: T7 Endonuclease 1

TALEN: Transcription Activator-Like Effector Nucleases

TDGF1: Teratocarcinoma-Derived Growth Factor 1

TE: Trophectoderm

TGFbeta: Transforming Growth Factor beta

TP53: Tumor Protein P53

TUBB3: Tubulin beta 3

U

UTR: UnTranslated Region

V

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VPA: Valproic Acid

WXYZ

WNT: Wingless Int

XCI: X Chromosome Inactivation

ZFN: Zinc Finger Nuclease

ZFP42 : Zinc Finger Protein 42 homolog

INTRODUCTION

Introduction

1. Les cellules souches embryonnaires humaines (hES)

1.1 Le développement embryonnaire précoce

La fécondation, au cours de laquelle les gamètes mâle et femelle s'unissent, conduit à la formation du zygote (Figure 1). Pendant les premiers jours qui suivent la fécondation, le zygote subit une série de divisions dont l'ensemble est appelé la segmentation. Après quatre jours, on compte 16 à 32 cellules formant la morula. A partir du 4^{ème} jour, une cavité (blastocèle) se crée et les cellules de la morula se réorganisent en blastocyste. A ce stade, le blastocyste est composé de cellules de la masse interne¹ (ICM pour « inner cell mass »), une vingtaine de cellules entourées du trophoctoderme². Ce dernier formera le placenta supportant la croissance de l'embryon à l'intérieur de l'utérus alors que les cellules de l'ICM vont proliférer pour former l'épiblaste³ et l'endoderme primitif⁴ qui donneront lieu à leur tour à tous les types cellulaires nécessaires pour former le corps de l'embryon. Le blastocyste s'implante dans la paroi utérine aux environs du 8^{ème} jour (Beddington and Robertson, 1999).

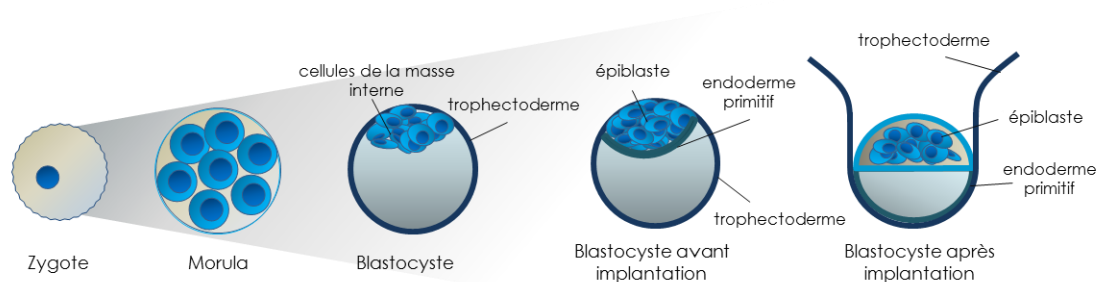


Figure 1: Développement embryonnaire précoce. Le zygote est formé après la fécondation et se développe en quelques jours pour atteindre le stade de la morula. Au stade blastocyste, sous l'influence de la pression hydrostatique, une cavité se crée : le blastocèle. Les cellules de l'endoderme primitif et de l'épiblaste forment un amas compact d'un côté de la cavité et les cellules du trophoblaste, s'organisent en un épithélium, le trophoctoderme.

1.2 Découverte et origine des mES

¹ Masse interne : cellules entourées de trophoctoderme à l'intérieur du blastocyste. Elles donneront l'épiblaste et l'endoderme primitif.

² Trophoctoderme : couche de cellules externes de la morula puis du blastocyste qui donnera notamment le placenta

³ Epiblaste : cellules à l'intérieur du blastocyste qui donneront naissance aux 3 feuillets cellulaires de l'embryon

⁴ Endoderme primitif : forment la première couche délimitant l'épiblaste et sera remplacé lors de la gastrulation par la première poussée de migration cellulaire provenant de l'épiblaste, qui formera l'endoderme

Au début des années 1980, des cellules souches embryonnaires « naïves » de souris (mES pour « mouse embryonic stem cells ») ont été mises en culture pour la première fois à partir de l'ICM de blastocystes murins avant implantation (Evans and Kaufman, 1981) (Figure 2). Après l'implantation du blastocyste, des cellules mES « primed » épiblastiques ou mEpiSC (pour « mouse Epiblast-derived Stem Cell») peuvent également être dérivées et mises en culture (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). Les cellules « naïves » mES et « primed » mEpiSC possèdent les mêmes caractéristiques essentielles des cellules ES (voir 1.4 propriétés des hES) mais les cellules mEpiSC se différencient plus rapidement que les cellules mES et demandent beaucoup plus de précautions lors de leur manipulation *in vitro*. De plus, les mES et mEpiSC nécessitent des conditions de culture très différentes (Figure 2). Les cellules mES sont cultivées sur une couche de gélatine comme matrice extracellulaire et nécessitent la présence de Leukemia Inhibitory Factor (LIF) (Evans and Kaufman, 1981), tandis que les mEpiSC sont cultivées sur une couche de cellules nourricières constituée de fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) et nécessitent la présence de facteur de croissance des fibroblastes de type 2 (FGF2 pour « fibroblast growth factor type 2) (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). Ainsi, il a été proposé qu'il y ait, lors du développement embryonnaire, deux états successifs distincts de pluripotence : « naïve » ou « primed » (Nichols and Smith, 2009).

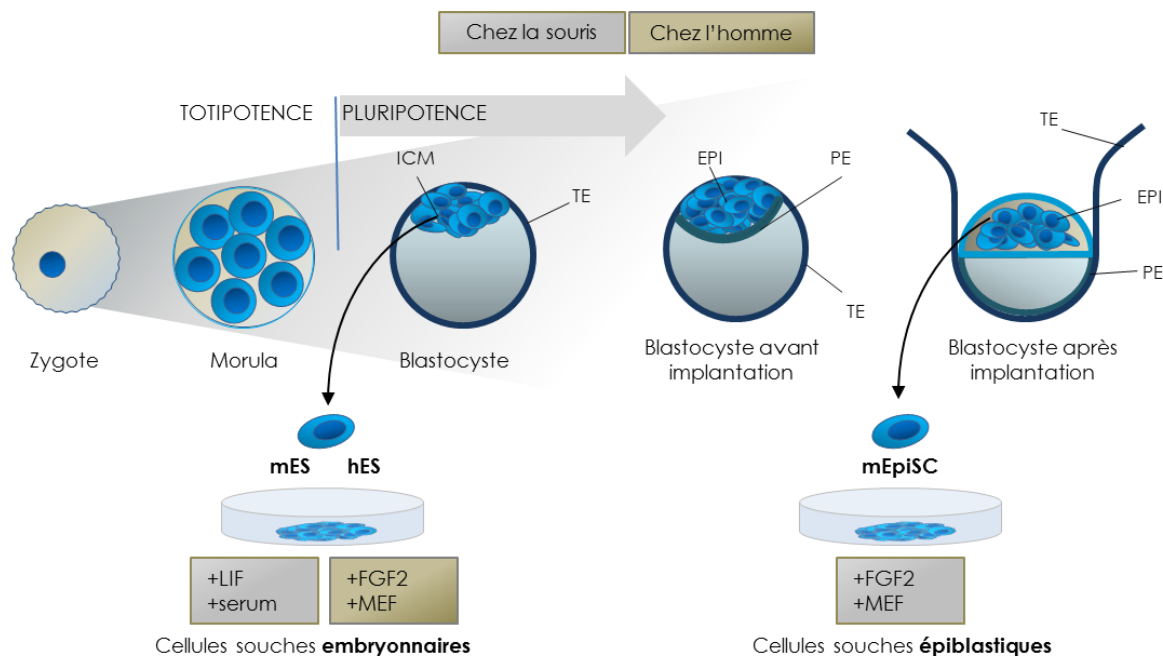


Figure 2: Origine des mES, mEpiSC et hES. Les cellules de la morula sont totipotentes car elles contribuent à toutes les lignées cellulaires humaines. Les cellules pluripotentes mES et hES sont mises en culture à partir de cellules de la masse interne (ICM)

dérivées au stade blastocyttaire avant l'implantation utérine. Les mEpiSC proviennent de cellules de l'épiblaste (EPI) après l'implantation du blastocyste. Les conditions de culture diffèrent chez l'homme (encadré brun) et la souris (encadré en gris). Abréviations : ICM = cellule de la masse interne ; TE = trophoctoderme ; EPI = épiblaste ; PE = endoderme primitif. Adapté de Rossant, 2013.

1.3 Découverte et origine des hES

Les cellules souches embryonnaires humaines ou hES (pour « human embryonic stem cells ») ont quant à elles été isolées en 1998 à partir de la masse interne du blastocyste d'embryons surnuméraires obtenus après fécondation in vitro (FIV) (Thomson et al., 1998) (Figure 2). Techniquement, les embryons sont cultivés jusqu'au stade blastocyste et 14 cellules de la masse interne sont ensuite isolées pour donner une lignée de cellules hES (Thomson et al., 1998). Ce processus de génération d'hESCs est à l'origine de nombreuses questions éthiques et morales quant à la destruction de cellules capables de donner la vie (Robertson et al., 2001). De manière intéressante, les cellules hES partagent plus de similarités avec les cellules « primed » mEpiSC qu'avec les cellules mES. Les hES sont également cultivées sur une couche de MEF et nécessitent la présence de FGF2 (Thomson et al., 1998) (Figure 2). Sans ces conditions de culture optimales, les hES se différencient rapidement.

En plus des similarités en termes de nutriments nécessaires à leur croissance, les cellules hES et mEpiSCs forment en culture des colonies aplaties, ont une faible capacité de croissance clonale et possèdent les mêmes patrons d'expression géniques (Brons et al., 2007 ; Tesar et al., 2007). Les récentes tentatives de dériver des hES ayant des propriétés plus proches des mES naïves sont quelque peu controversées et contradictoires (Gafni et al., 2013; Takashima et al., 2014) (Theunissen et al., 2014; Ware et al., 2014). Les hES se différencient toujours rapidement et spontanément et pourraient ne jamais passer par un état naïf stable. L'induction de la pluripotence pourrait donc être différente selon les espèces et avoir des conséquences sur les processus de différenciation ultérieurs (Rossant, 2015). Malgré ces différences entre mES et hES, les voies fondamentales de différenciation et les principaux processus développementaux sont plutôt bien conservés.

1.4 Propriétés des hES

1.4.1 Morphologie

Les cellules hES possèdent un gros noyau, un petit cytoplasme et des nucléoles proéminents (Thomson et al., 1998). Une fois prélevées et mises en culture, les hES prolifèrent sous forme d'amas cellulaires uniformes et caractéristiques appelés colonie (Figure 3).

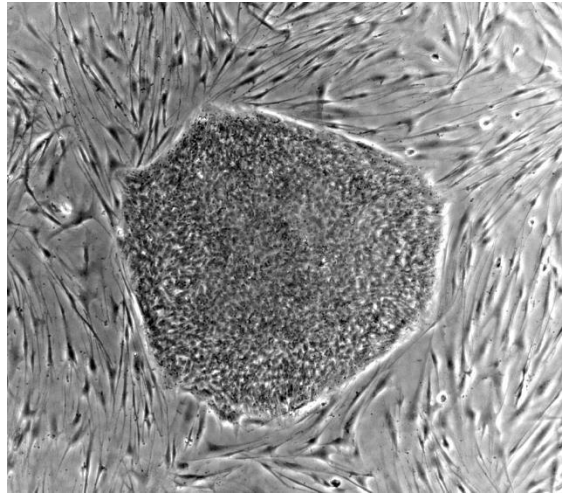


Figure 3 : Morphologie caractéristique d'une colonie de cellules hES sur un tapis de cellules MEFs nourricières.

1.4.2 Caryotype

Les hES présentent le caryotype diploïde normal du blastocyste dont elles proviennent : 23 paires de chromosomes dont une paire de chromosomes sexuels (XX ou XY) (Reubinoff et al., 2000; Thomson et al., 1998). La culture à long terme des hES est associée à l'accumulation d'anomalies chromosomiques (Cowan et al., 2004; Draper et al., 2004). Une surveillance régulière de l'intégrité du génome des hES est donc nécessaire puisque les altérations génomiques peuvent changer le potentiel et la capacité de développement des hES (Ben-David et al., 2010; Lister et al., 2011). Le plus souvent, ces modifications correspondent à un accroissement (total ou partiel) du nombre de chromosomes 12, 17, 20 ou X (Baker, 2007; Laurent et al., 2011; Taapken et al., 2011).

1.4.3 Activité télomérase

Les hES, à la différence des cellules somatiques différenciées⁵, expriment des niveaux élevés d'activité télomérase (Thomson et al., 1998). La télomérase est une ribonucléoprotéine⁶ qui

⁵ Cellule somatique : toute cellule du corps à l'exception des cellules germinales.

ajoute des répétitions (télomères⁷) aux extrémités des chromosomes. Chez l'homme, la télomérase est fortement exprimée dans les cellules germinales et les cellules cancéreuses et est associée à une capacité de prolifération infinie (Counter et al., 1992; Hastie et al., 1990; Wright et al., 1996).

1.4.4 Expression de marqueurs moléculaires spécifiques

En plus des gènes de pluripotence (voir paragraphe suivant), les hES expriment des marqueurs de surface caractéristiques et spécifiques tels que les glycoprotéines SSEA-3 (pour « Stage-Specific Embryonic Antigen – 3 »), SSEA-4, TRA-1-60 et TRA-1-81. La réalisation d'immunomarquages contre ces protéines permet de vérifier le statut indifférencié des hES. Les cellules hES expriment également l'alkaline phosphatase, une enzyme liée à la membrane qui catalyse l'hydrolyse du phosphate de nombreuses molécules (Stefkova et al., 2015).

1.4.5 Pluripotence

Les hES sont caractérisées par une propriété essentielle : la pluripotence ou la capacité de se différencier en n'importe quelle cellule spécialisée, mises à part les cellules placentaires qui forment un tissu extra-embryonnaire (Evans and Kaufman, 1981; Thomson et al., 1998). En effet, les hES, en absence de FGF2, sont capables de se différencier spontanément en cellules des trois feuilletts embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme) (Thomson et al., 1998) (Itskovitz-Eldor et al., 2000). Les différents feuilletts embryonnaires peuvent également être induits spécifiquement à partir des hES par l'ajout au milieu de culture de facteurs de croissance et petites molécules spécifiques. Quelques stratégies de différenciation et les principaux facteurs utilisés *in vitro* sont décrits dans les paragraphes qui suivent, pour chacun des feuilletts :

- Ectoderme

⁶ Ribonucléoprotéine : protéine qui contient de l'ARN comme par exemple les ribosomes.

⁷ Télomère : région hautement répétitive d'ADN à l'extrémité d'un chromosome évitant que celui-ci ne s'effiloche et empêchant que son extrémité ne soit considérée comme une cassure du double brin d'ADN, pouvant conduire à une réparation dommageable.

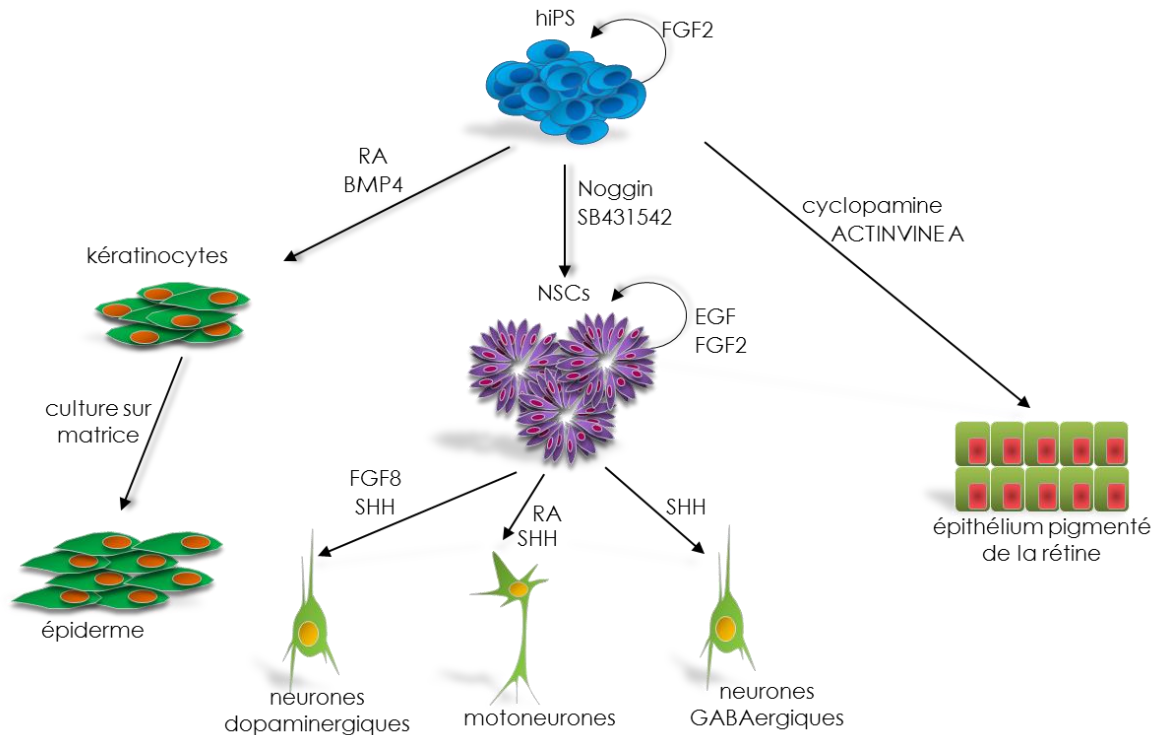


Figure 4: Stratégies de différenciation dans les principales voies ectodermes. Alors que l'inhibition de la signalisation SMAD (par Noggin et SB431542) induit les cellules neuroectodermes, l'ajout d'acide rétinoïque (RA) et BMP4 induit le destin épidermique. La cyclopamine, un inhibiteur de la voie SHH, et l'actine A induisent le destin optique.

Un traitement des cellules hES en culture avec l'acide rétinoïque (RA pour « retinoïc acid ») et BMP4 (pour « bone morphogenetic protein 4 ») oriente la différenciation en kératinocytes (Petrova et al., 2014) (Figure 4). Pour induire d'autres cellules dérivées de l'ectoderme telles que les neurones, la première étape consiste à induire la formation de cellules souches neurales multipotentes⁸ ou NSCs (pour « neural stem cells »). Pour ce faire, les cellules hES sont cultivées en présence de Noggin et SB431542, deux inhibiteurs de la signalisation SMAD qui est impliquée dans le maintien de la pluripotence des hES (Chambers et al., 2009; Zhou et al., 2010). Les différents types de neurones peuvent être induits à partir de ces progéniteurs par ajout de facteurs spécifiques (revu dans Han et al., 2011) : par exemple, la présence de Sonic Hedgehog (SHH) seul induit la différenciation en neurones GABAergiques (Wang et al., 2015), l'ajout de SHH et de FGF8 permet de générer des neurones dopaminergiques (Chambers et al., 2009; Cho et al., 2008; Hargus et al., 2010; Nguyen et al., 2011; Park and Lee, 2007), et l'addition au milieu

⁸ Multipotente : une cellule multipotente est une cellule progénitrice qui garde un certain potentiel de différenciation.

de culture de SHH et RA induit la formation de motoneurones (Boulting et al., 2011; Dimos et al., 2008).

– Mésoderme

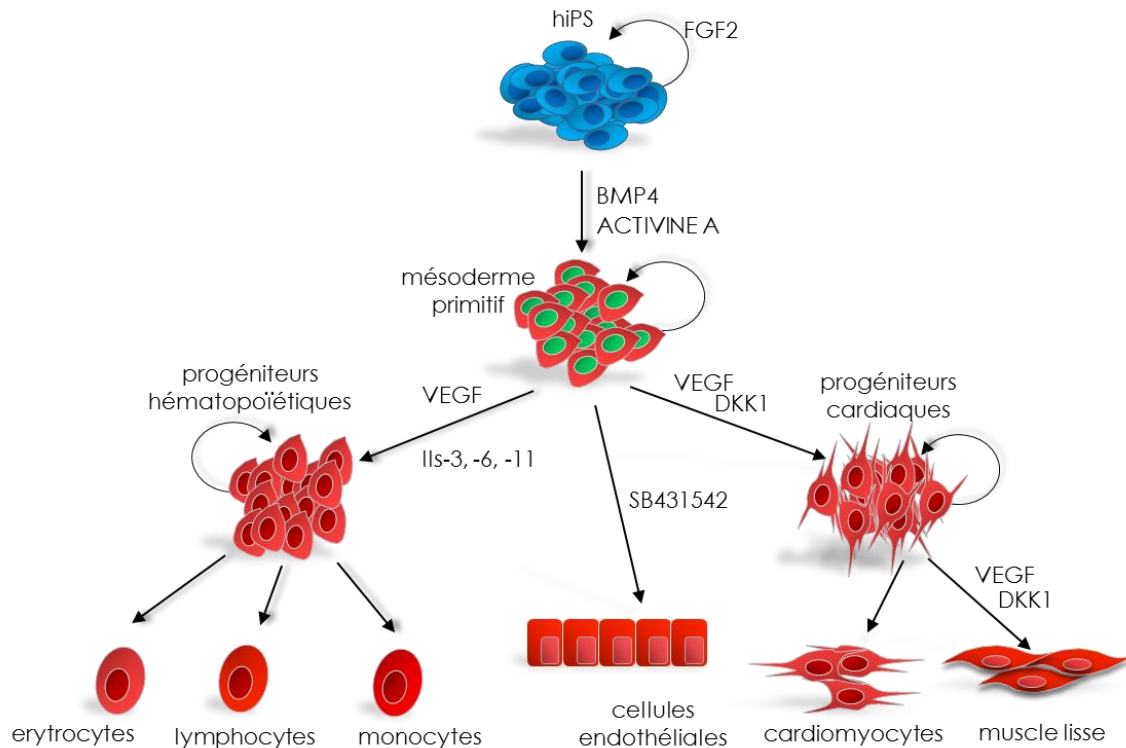


Figure 5: Stratégies de différenciation dans les principales voies mésodermiques. L'activation de la voie BMP et TGFbeta est importante pour l'induction mésodermique à partir de cellules hES. Ensuite un traitement des cellules avec du VEGF en combinaison avec un cocktail d'interleukines (ILs) induit la voie hématopoïétique. En combinaison avec DKK1, un inhibiteur de la voie WNT, VEGF induit de destin cardiaque. Les cellules endothéliales peuvent être obtenues directement à partir du mésoderme primitif en bloquant la voie TGFbeta avec SB431542.

Les cellules sanguines, osseuses, musculaires et cardiaques se développent de manière séquentielle à partir de progéniteurs mésodermiques (Rajala et al., 2011) (Figure 5). Ceux-ci sont obtenus à partir de cellules hES par l'activation des voies TGFbeta (pour « transforming growth factor beta ») et BMP via l'ajout au milieu de culture respectivement, d'activine A et de BMP4 (Carpenter et al., 2012; Yamashita et al., 2005). Par la suite, un traitement prolongé avec du DKK1 (« Dickkopf-related protein 1 »), un inhibiteur de la voie WNT, et du VEGF (« vascular endothelial cell growth factor »), induit la différenciation de ces progéniteurs mésodermiques en cardiomyocytes (Masumoto et al., 2014; Ye et al., 2013). D'autre part, le traitement des progéniteurs mésodermiques avec un cocktail d'interleukines spécifiques (IL-3, -6, -11) conduit à

la formation de progéniteurs hématopoïétiques puis des différentes cellules sanguines (Lachmann et al., 2015; Slukvin, 2013). Les cellules endothéliales vasculaires peuvent être induites directement à partir du mésoderme primitif par inhibition de la voie TGFbeta via l'ajout de SB431542 au milieu de culture (James et al., 2010).

- Endoderme

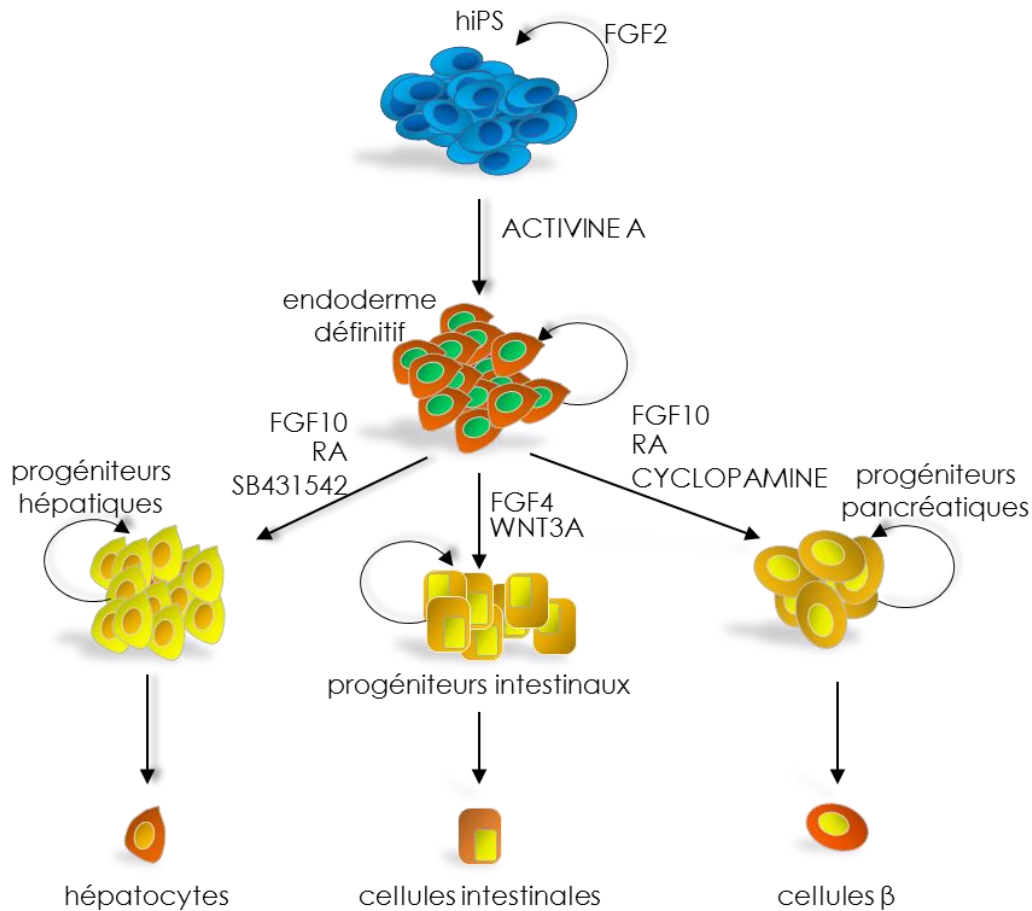


Figure 6: Stratégies de différenciation dans les principales voies endodermes. L'induction de la voie TGFbeta et des FGFs joue un rôle majeur dans l'induction de l'endoderme. Les progéniteurs hépatiques sont induits avec FGF10, RA et SB431542. Les progéniteurs intestinaux sont induits par FGF4 et WNT3a. Les progéniteurs pancréatiques sont quant à eux induits par FGF10, RA et la cyclopamine.

La plupart des organes internes tels que l'intestin, le pancréas et le foie sont des dérivés de l'endoderme (Figure 6). L'ACTIVINE A joue un rôle majeur dans l'induction de l'endoderme définitif à partir de cellules hES, première étape à l'origine de tous les dérivés endodermiques (McLean et al., 2007). Par la suite, l'ajout de FGF10, de RA et de SB431542 oriente l'endoderme

vers des progéniteurs hépatocytaires (Takayama et al., 2013; Yu et al., 2012) tandis que la combinaison de FGF10, de RA et de cyclophamide, un inhibiteur de la signalisation SHH, induit un destin « pancréatique » (Kumar et al., 2014; Shaer et al., 2015). Enfin, l'activation des voies FGF et WNT permet l'induction des progéniteurs intestinaux (Spence et al., 2011).

In vivo, les hES sont également pluripotentes. En effet, quelques semaines après leur injection à des souris immunodéficientes (pour éviter un rejet des cellules greffées), les hES produisent spontanément des masses tumorales, appelées tératomes, contenant des cellules endodermiques, mésodermiques et ectodermiques (Reubinoff et al., 2000; Thomson et al., 1998).

1.4.6 Auto-renouvellement

Les hES sont caractérisées par une deuxième propriété essentielle : l'auto-renouvellement. Les hES sont en effet capables de proliférer indéfiniment, tout en maintenant un état indifférencié.

– Voies intrinsèques

Plusieurs facteurs intrinsèques tels que des facteurs de transcription et des micro-ARNs interviennent dans le maintien de l'auto-renouvellement des hES indifférenciées via des voies de régulation transcriptionnelles. Les principaux facteurs de transcription impliqués sont NANOG, OCT4 et SOX2 :

- NANOG

NANOG (de la mythologie irlandaise *Tir na nog*, terre de jouvence) est un facteur de transcription découvert lors d'un criblage moléculaire à la recherche de facteurs pouvant subvenir à la croissance des mES en absence de LIF (Chambers et al., 2003; Mitsui et al., 2003). La protéine NANOG est composée de 305 acides aminés incluant un domaine central de liaison à l'ADN « hélice-boucle-hélice » (ou homéodomaine) de 60 acides aminés très conservé à travers les espèces (84% d'homologie entre l'homme et la souris) (Berger et al., 2008; Gehring et al., 1994; Noyes et al., 2008). NANOG joue un rôle central dans le maintien de la pluripotence des hES (Chambers et al., 2003) (Hart et al., 2004)). Elle est exprimée par les cellules de l'ICM et les cellules germinales et est ensuite réprimée durant l'embryogenèse dans les cellules en différenciation (Hart et al., 2004). La répression de l'expression de NANOG dans les cellules

hES engendre leur différenciation en trophoctoderme et cellules extra-embryonnaires (Hyslop et al., 2005) tandis que sa surexpression permet de les cultiver de manière indifférenciée en absence de cellules nourricières (Darr and Benvenisty, 2006).

- OCT4

Chez l'homme, le facteur de transcription OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) est encodé par le gène *POU5F1* (*POU domain, class 5, transcription factor 1*). Le gène *POU5F1* peut générer 3 transcrits (OCT4A, OCT4B et OCT4B1) et 4 isoformes protéiques (OCT4A, OCT4B-190, OCT4B-265, and OCT4B-164) (Rosner et al., 1990; Wang and Dai, 2010). Parmi ces isoformes, seule OCT4A (OCT4 dans la suite du texte) (qui partage 87% d'homologie de séquence avec OCT4 murin) est fortement et spécifiquement exprimée dans les cellules hES (Wang and Dai, 2010). OCT4 appartient à la famille POU (acronyme des gènes Pit-1 Oct-1 Unc-86⁹) des facteurs de transcription à homéodomaine et comprend 3 domaines : un domaine central de liaison à l'ADN « POU », un domaine N-terminal de trans-activation et un domaine C-terminal de trans-activation spécifique en fonction du type cellulaire (Herr and Cleary, 1995). OCT4 est essentiel au développement embryonnaire précoce et, en son absence chez la souris, les embryons meurent au moment de l'implantation suite à une diminution drastique du nombre de cellules pluripotentes de la masse interne (Nichols et al., 1998). Un niveau d'expression précis d'OCT4 semble être nécessaire au maintien de la pluripotence des hES (Niwa et al., 2000). En effet, une diminution d'expression d'OCT4 est associée à la perte de pluripotence et la différenciation en trophoctoderme¹⁰ tandis que sa surexpression induit une différenciation en endoderme et mésoderme primitifs (Boyer et al., 2006; Nichols et al., 1998; Niwa et al., 2000).

- SOX2

SOX2 (SRY-related HMG box 2) est un facteur de transcription de la famille des facteurs de transcription SOX à domaine de liaison à l'ADN de type « HMG » (*High Mobility Group*) essentiel pour le maintien de l'auto-renouvellement des cellules hES indifférenciées (Avilion et

⁹ Pit-1 Oct-1 Unc-86 : acronyme du domaine POU qui provient des gènes mammaliens (Pit-1 Oct-1 Oct-2) et de *C. elegans* (Unc-86) à partir desquels il fut découvert (Herr et al, 1988).

al., 2003; Wang et al., 2012). Les facteurs de transcription SOX contrôlent l'expression de leurs gènes cibles par liaison à une séquence consensus heptamérique : 5' – A(/T) A(/T) C A A A(/T) G – 3' (Denny et al., 1992). Les protéines SOX sont classées en 8 groupes sur base de leur homologie de séquence (Lefebvre et al., 2007). *SOX2* fait partie du groupe des facteurs de transcription SOXB1 avec *SOX1* et *SOX3* (Lefebvre et al., 2007). *SOX2* est fortement exprimée dans les cellules hES et la transfection de petits ARN interférants (siARN pour « small interference RNA ») dirigés contre *SOX2* (ayant pour conséquence une diminution de son expression) conduit à la formation de trophectoderme (Fong et al., 2008). D'autre part, plusieurs études montrent que le niveau d'expression de *SOX2* d'une cellule est corrélé à son état de différenciation au cours du développement et reflète ses propriétés de cellule progénitrice (Arnold et al., 2011; Western et al., 2005). Par exemple, les cellules progénitrices optiques de la rétine continuent d'exprimer *SOX2* (Kamachi et al., 2000; Uchikawa et al., 1999) et qu'une diminution d'expression précise de *SOX2* est essentielle à leur différenciation correcte en cellules rétiniennes (Taranova et al., 2006). De même, lors du développement du système nerveux central (SNC), les cellules progénitrices neurales continuent d'exprimer *SOX2* (Ferri et al., 2004; Li et al., 1998; Zappone et al., 2000). Ensuite, à l'âge adulte, l'expression de *SOX2* est réduite à une petite population de cellules souches neurales adultes et n'est pas présente dans les neurones matures du cerveau (Ferri et al., 2004).

NANOG, OCT4 et *SOX2* forment un réseau de boucles d'autorégulation positives conservées chez l'homme et la souris (Figure 7) (Gagliardi et al., 2013; Wang et al., 2012).

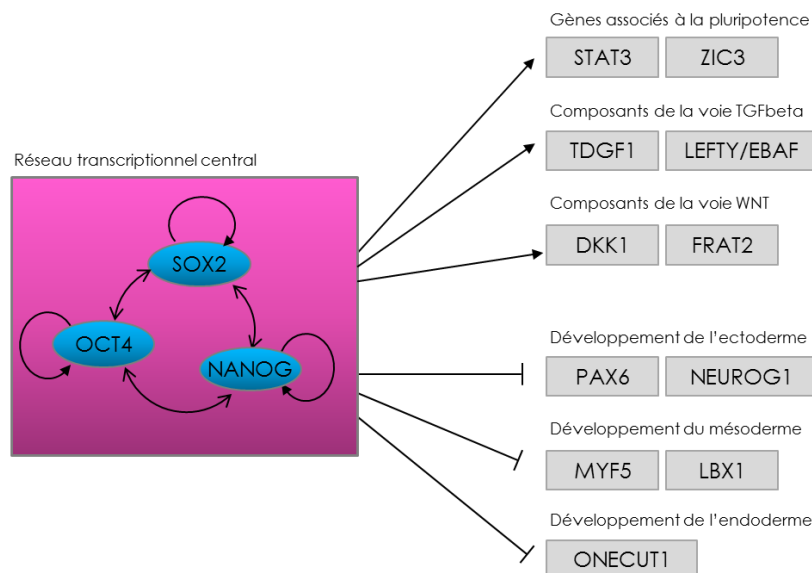


Figure 7: Régulation transcriptionnelle de la pluripotence des cellules hES. OCT4, SOX2 et NANOG constituent le réseau transcriptionnel central de la pluripotence qui régule positivement d'autres gènes associés à la pluripotence et des composants des voies de signalisation TGFbeta et WNT et, négativement, des gènes impliqués dans le développement des différents feuillets embryonnaires. Adapté de MacArthur et al., 2009.

Les protéines NANOG, OCT4 et SOX2 forment un complexe qui active leur expression respective en se liant à leur propre promoteur (Boyer et al., 2006; Mitsui et al., 2003). De plus, ce complexe lie simultanément le promoteur de nombreux gènes dans les cellules hES en les activant ou en les réprimant (Boyer et al., 2006). Les gènes cibles activés sont connus pour être impliqués directement ou indirectement dans le maintien de la capacité d'auto-renouvellement. Parmi ces gènes, on peut citer l'activation de plusieurs facteurs de transcription associés à la pluripotence (STAT3 et ZIC3 par exemple), de composants des voies de signalisation du TGFbeta (TDGF1, LEFTY/EBAF) et de WNT (DKK1, FRAT2) (Chambers et al., 2003 ; Boyer et al., 2006). Les gènes cibles réprimés codent quant à eux pour des facteurs de transcription ayant un rôle dans la différenciation (Boyer et al., 2006). Ceux-ci comprennent des régulateurs connus pour être impliqués dans le développement des trois feuillets embryonnaires tels que PAX6 et NEUROG1 (neurectoderme), MYF5 et LBX1 (mésoderme) ou ONECUT1 (endoderme) (Mitsui et al., 2003 ; Chambers et al., 2003).

- Régulation par les micro-ARNs (miARNs)

Les miARNs sont des ARNs simple brin d'une vingtaine de nucléotides qui se lient directement à des séquences cibles partiellement complémentaires des extrémités 3' non traduites (3'UTR pour

« 3' untranslated region ») de l'ARN messager (ARNm), entraînant une dégradation des ARNm cibles, ou une répression de la traduction (Bartel, 2004). Dans le génome, les miARNs sont regroupés en « clusters ». Ils sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires, telles que la prolifération, la différenciation et l'apoptose, en régulant précisément l'expression des gènes. Plus de 100 miARNs sont exprimés spécifiquement dans les cellules hES, mais les gènes cibles de la plupart d'entre eux restent méconnus (Morin et al., 2008; Suh et al., 2004). La pluripotence des cellules hES est, entre autres, liée à l'expression de plusieurs miARNs dont les principaux clusters sont les miR-372, miR-302 et miR-106 (Bar et al., 2008; Laurent, 2008; Morin et al., 2008; Suh et al., 2004). Ces clusters sont activés par OCT4 et SOX2 et sont nécessaires à la prolifération des cellules hES en ciblant les régulateurs négatifs du cycle cellulaire tels que p21^{Cip1} – un inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines - ou p130 une protéine homologue à pRb (Leonardo et al., 2012; Wang et al., 2008) (Figure 8).

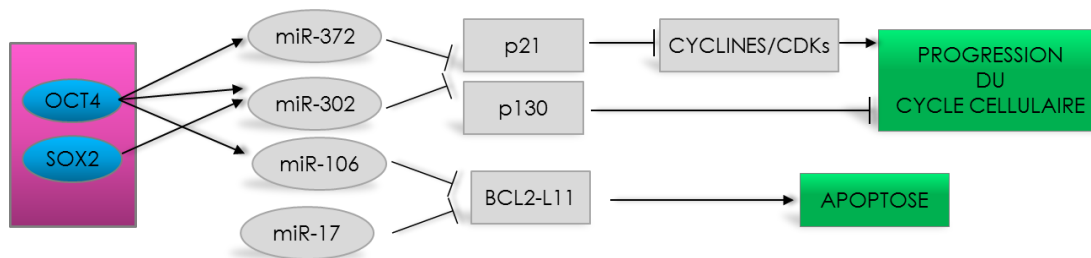


Figure 8: Régulation de la pluripotence des hES par les micro-ARNs. Chez l'homme les miARNs jouent un rôle important dans le maintien de la prolifération des hES en inhibant certains inhibiteurs du cycle cellulaire tels que p21 et p130, et une protéine pro-apoptotique, BCL2-L11.

Les miRNAs jouent également un rôle important dans l'inhibition de l'apoptose des cellules hES. Par exemple, les clusters miR-17 et miR-106 inhibent l'apoptose en réprimant le facteur de transcription BCL2-L11 (pour « BCL2-like 11 ») (Matsubara et al., 2007). BCL2-L11 est un facteur pro-apoptotique de la famille BIM dont la surexpression entraîne la libération de cytochrome c par la mitochondrie et l'induction de la voie intrinsèque de l'apoptose (O'Connor et al., 1998).

– Voies extrinsèques

Les applications biomédicales des cellules souches dépendent de la capacité de manipuler librement leur destin cellulaire. Beaucoup de facteurs déterminants dans l'identité « ES » sont

génétiques (voir paragraphe précédent) et il est très difficile d'agir directement sur leur transcription sans l'aide de méthodes génétiques laborieuses et inefficaces. Du coup, les efforts se sont concentrés sur le contrôle des propriétés d'auto-renouvellement à l'état indifférencié par l'utilisation de facteurs extrinsèques tels que des facteurs de croissance ou des petites molécules synthétiques. Ainsi, plusieurs voies de signalisation associées à ces facteurs sont impliquées dans le maintien d'un état indifférencié dont la voie WNT/ β -caténine, la voie TGF β /SMAD, les FGFs et la voie des Rho GTPases.

- WNT/ β -caténine

La présence du ligand WNT empêche la dégradation de la β -caténine en réprimant l'accumulation cytoplasmique du complexe inhibiteur GSK3 β /APC/AXIN (Figure 9).

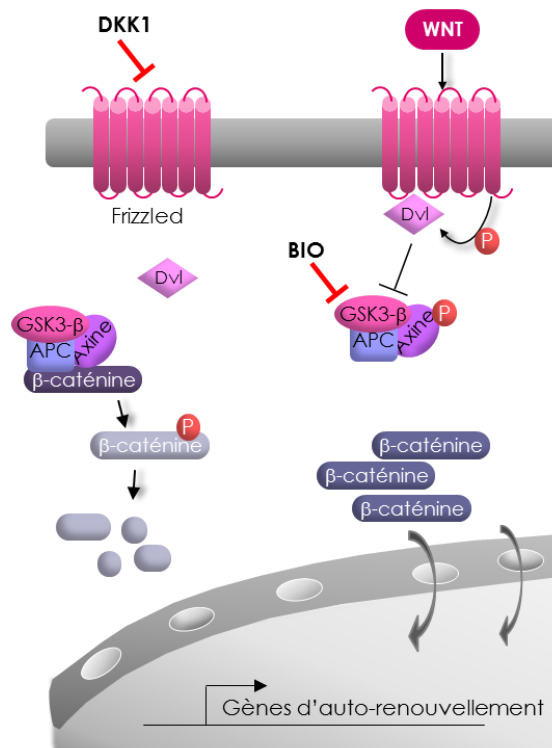


Figure 9: Voie de signalisation WNT/ β -caténine. La présence du ligand Wnt aboutit à la stabilisation de la β -caténine et à la transcription de gènes cibles. En l'absence de ligands (ou en présence de l'inhibiteur DKK1), la β -caténine est phosphorylée par le complexe protéique constitué de l'APC, GSK-3 et l'Axine, puis est dégradée par le protéasome.

La β -caténine ainsi stabilisée peut transloquer dans le noyau et induire la transcription de gènes cibles impliqués dans l'auto-renouvellement des cellules hES. Ainsi, l'utilisation de petites molécules inactivant la GSK-3 β , telles que le 6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO) ou le

CHIR99021 permet de maintenir les hES dans un état indifférencié (Sato et al, 2004) (Figure 9). Les mécanismes moléculaires impliqués et la fonction exacte de la voie WNT/ β -caténine dans la maintenance de la pluripotence des hES restent mal compris. Bien que certaines études montrent que l'activation de la voie WNT/ β -caténine est impliquée dans l'auto-renouvellement des hES (Sato et al., 2004; Singla et al., 2006), plusieurs études concluent que l'activation de cette voie augmente transitoirement la prolifération et l'auto-renouvellement des hES, mais ne permet pas le maintien de leur statut indifférencié en culture à long terme (Cai et al., 2007; Dravid et al., 2005; Hasegawa et al., 2005; Ullmann et al., 2008). Ainsi, l'addition des protéines recombinantes WNT1 ou WNT3a au milieu de culture stimule la prolifération des hES (Cai et al., 2007; Dravid et al., 2005), mais ne suffit pas à maintenir la pluripotence à long terme (Sumi et al., 2008).

- TGF β /SMAD

La super famille des facteurs de croissance TGF β est composée d'une trentaine de membres dont les TGF β , les activines, les BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*) et Nodal (Figure 10).

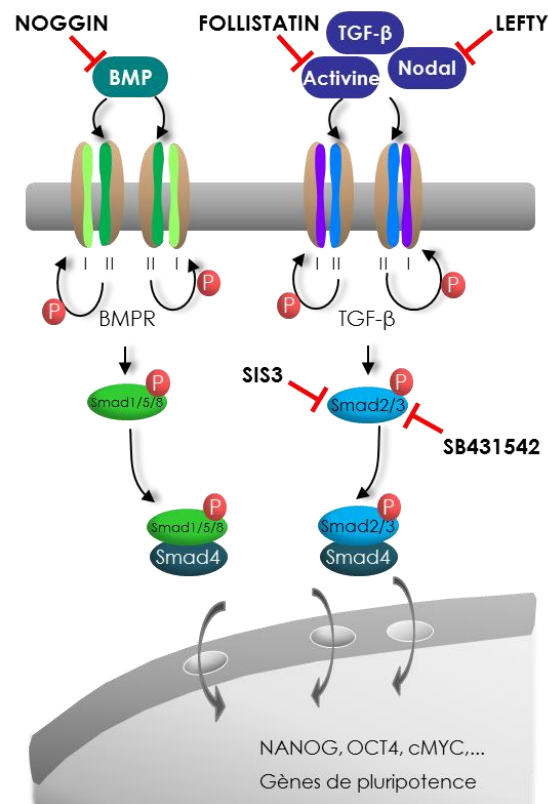


Figure 10: Voie de signalisation TGFbeta/SMAD. La voie TGFbeta/SMAD induit une réponse cellulaire via des récepteurs de type I et de typeII ayant une activité de type serine/thréonine kinase. La transduction du signal des récepteurs jusqu'au noyau est assurée principalement par la phosphorylation d'une famille de protéines cytoplasmiques conservées au cours de l'évolution, les SMADs. Les SMADs phosphorylées s'assemblent et forment des complexes hétéromériques avec la molécule co-régulatrice

SMAD4 puis transloquent dans le noyau où ils lient l'ADN et régulent l'expression de gènes cibles tels que NANOG et OCT4. Noggin bloque la voie des BMPs tandis que SIS3 et SB431542 bloque la signalisation TGFbeta via SMAD2/3.

Cette famille de cytokines est impliquée dans de nombreux processus biologiques incluant la morphogenèse, la différenciation, la prolifération et l'apoptose. Il existe deux voies principales de signalisation, la voie des TGFβ/activine/nodal et la voie des BMPs (Shi and Massague, 2003). Les 2 voies sont initiées de la même manière par la liaison du ligand spécifique aux récepteurs transmembranaires de type I et II. Chez l'homme, il existe sept récepteurs de type I (ALK1-7) et cinq récepteurs de type II dans (Shi and Massague, 2003). Les ligands permettent la formation d'un complexe hétérotetramérique dans lequel les récepteurs de type II phosphorylent et activent les récepteurs de type I. Ensuite l'activité sérine/thréonine kinase du domaine intracellulaire des récepteurs de type I phosphoryle un groupe de molécules de signalisation intracellulaire : les protéines SMAD (SMAD1, 2, 3, 5 et 8). Les SMADs phosphorylées s'assemblent et forment des complexes hétéromériques avec la molécule co-régulatrice SMAD4. Les complexes SMAD activés transloquent dans le noyau où ils lient l'ADN et régulent l'expression de gènes cibles (Shi and Massague, 2003). Dans les cellules hES, l'activation de la voie BMP induit la différenciation en mésoderme ou tissu extra-embryonnaire alors que son inhibition par NOGGIN maintient les cellules hES dans un état indifférencié (Xu et al., 2005; Zhang et al., 2008). Les propriétés d'auto-renouvellement des cellules hES reposent sur la voie TGFbeta/ACTIVINE/NODAL/SMAD2/3 et l'inhibition de cette signalisation par le SB431542 engendre une perte de la pluripotence et une différenciation rapide (Vallier et al., 2009). Des résultats similaires ont été obtenus par l'ajout au milieu de culture d'autres inhibiteurs de cette voie comme LEFTY et FOLLISTATIN (Vallier and Pedersen, 2005; Xiao et al., 2006) (Figure 10). Plusieurs études ont montré que SMAD2/3 lie le promoteur et induit l'expression de plusieurs gènes régulateurs de la pluripotence tels que *NANOG* et *OCT4* (Brown et al., 2011; Mullen et al., 2011).

- FGFs

La voie de signalisation des facteurs de croissance des fibroblastes (FGFs, pour *fibroblast growth factors*) est activée suite à l'interaction du FGF avec son récepteur spécifique (FGFR) et conduit à l'autophosphorylation de résidus tyrosine sur la partie intracellulaire du FGFR. Il existe 4

récepteurs au FGF (FGFR1-4) et une vingtaine de FGF différents (FGF1-20) (Itoh, 2007). Suite à l'interaction FGF-FGFR, un arrimage de protéines adaptatrices telles que FRS2 (FGF Receptor Substrate 2) et GRB2 (Growth factor Receptor-Bound protein 2) se produit. (Figure 11).

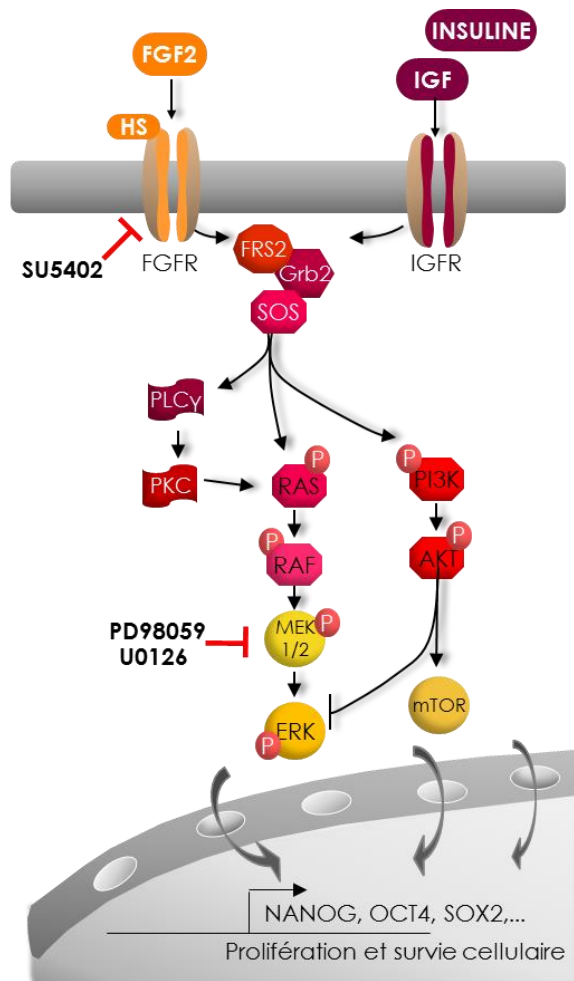


Figure 11: Voie de signalisation des FGFs. La liaison du FGF à son récepteur (FGFR) induit sa dimérisation et l'activation des domaines tyrosine/kinase intracellulaires par phosphorylation. Les kinases activées phosphorylent FRS2 (« FGF Receptor Substrate 2 »). FRS2 activée lie la protéine GRB2 (« growth factor receptor-bound 2 ») qui recrute SOS (« son of sevenless ») et induit l'activation de la voie RAS/RAF/MEK/ERK (voie des MAP kinases) ou la voie PI3K (voie de la kinase AKT). L'activation de ces voies induit les gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire. La signalisation peut être bloquée notamment par SU5402 notamment qui inhibe le récepteur FGFR.

Trois voies de signalisation clés sont activées par les FGFRs : la voie PI3K/AKT, la voie RAS/MEK/ERK et la voie de la PLC γ (Phosphoinositide Phospholipase C γ) (Coutu and Galipeau, 2011; Greber et al., 2010; Lanner and Rossant, 2010). Contrairement aux mES, le FGF2 est nécessaire pour maintenir l'auto-renouvellement des cellules hES *in vitro* (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). En effet, l'activation de la voie PI3K/AKT induit la prolifération et la survie des hES (Greber et al., 2007; Vallier and Pedersen, 2005). Inversement, l'inhibition de la

voie RAS/MEK/ERK par des inhibiteurs spécifiques tels que PD98059 et U0126, ou par siARNs, diminue fortement les capacités de prolifération des cellules hES (Li et al., 2007b) (Figure 11). La voie des FGFs coopère avec la voie ACTIVINE/SMAD2/3 pour maintenir l'expression de NANOG dans les cellules hES Vallier (Vallier et al., 2009). Il a également été montré que le FGF2 induit les MEFs à sécréter de l'IGF-2, qui lui aussi active les cascades intracellulaires PI3K/AKT, MEK/ERK suite à la liaison à son récepteur IGFR et participe au maintien de la pluripotence des cellules hES en culture (Bendall et al., 2007).

- Les petites GTPases Rho ou Rho GTPases

Les hES présentent une propriété problématique qui les rend plus compliquées à manipuler que leurs homologues murines : elles sont vulnérables à l'apoptose suite à leur détachement ou leur dissociation cellulaire. Ainsi, les hES subissent une mort cellulaire massive après une dissociation complète et l'efficacité de clonage des hES dissociées est généralement de $\leq 1\%$ (Amit et al., 2000; Pyle et al., 2006). Cette propriété est dépendante de la voie de signalisation Rho. La signalisation Rho est très complexe et joue de nombreux rôles dans la prolifération cellulaire, la différenciation, la cytokinèse, la motilité, l'adhérence et la structure du cytosquelette (Jaffe and Hall, 2005). Au niveau moléculaire, les membres de la famille Rho, des petites protéines G appartenant à la superfamille des protéines Ras, comprennent une vingtaine de membres dont Rho et Rac sont les mieux connus (Burrige and Wennerberg, 2004). Ces Rho oscillent entre deux formes : la forme inactive liée à la GDP et la forme active liée à la GTP (Figure 12).

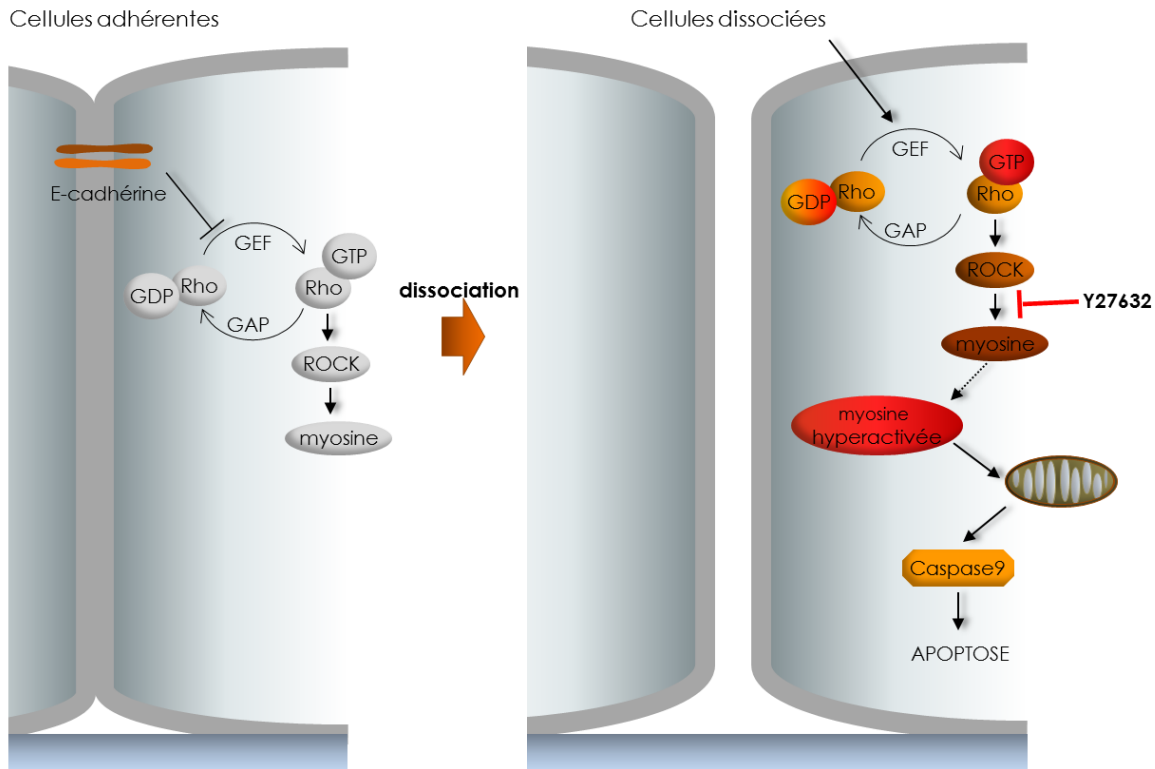


Figure 12: Voie des Rho-GTPases et la dissociation des cellules hES. A gauche, deux cellules hES adhérentes et à droite, deux cellules hES dissociées. La cadhérine E semble impliquée dans l'inhibition de la voie des Rho GTPases en condition adhérente. La dissociation cellulaire conduit à l'activation de la voie ROCK qui aboutit à l'hyperactivation de la myosine et une mort par apoptose induite par des forces de tensions intracellulaires trop importantes. L'ajout de Y-27634 empêche l'hyperactivation de la myosine en bloquant ROCK. Adapté de Ohgushi et al., 2010.

Cette transition est contrôlée par des régulateurs positifs et négatifs. Les régulateurs positifs, appelés GEFs (pour « guanine nucleotide exchange factors »), peuvent activer des molécules spécifiques de la sous-famille Rho. Les régulateurs négatifs, appelés GAPs (pour « GTPase-activating proteins »), peuvent inverser cette réaction en facilitant l'hydrolyse de la GTP en GDP. La forme de Rho liée à la GTP interagit avec les Rho-kinases (ROCK pour « Rho-dependent protein kinase »), induisant un changement conformationnel des ROCK et permettant une augmentation de leur activité kinasique (Harb et al., 2008; Krawetz et al., 2009; Riento et al., 2005). Dans les hES non dissociées, la signalisation Rho-ROCK est inhibée par un mécanisme dépendant de l'adhésion cellulaire médié par l'E-Cadhérine. Par contre, dans les cellules hES dissociées, la voie Rho-ROCK est activée et conduit à la hyper-phosphorylation de la MLC2 (« non muscle Myosin Light Chain 2 ») connue pour activer la myosine et créer des forces intracellulaires via le cytosquelette d'actomyosine (Charras and Paluch, 2008). L'hyperactivation et à la contraction excessive de la myosine est la cause principale de l'apoptose, observée dans les hES dissociées (Ohgushi et al., 2010). L'ajout d'Y-27632, un inhibiteur spécifique de ROCK au

milieu de culture, permet la survie des hES en condition clonale en bloquant la mort cellulaire induite par la dissociation (Watanabe et al., 2007).

2. Les cellules souches humaines à pluripotence induite (hiPS)

2.1 La découverte et l'origine de la reprogrammation

– Reprogrammation naturelle

Dès l'embryogenèse, le destin naturel du zygote est de proliférer, se diviser et se différencier progressivement. De nombreux mécanismes répriment, petit à petit, le programme génétique embryonnaire des cellules pour les guider vers un destin « adulte » (Slack, 2006 Essential Developmental Biology). L'étape ultime est la formation de cellules complètement matures et différenciées occupant une fonction bien précise dans l'organisme. Ce développement n'est pas irréversible. La reprogrammation est un processus naturel clé qui efface et réorganise l'épigénome de la cellule comme la méthylation de l'ADN et l'inactivation du chromosome X (ICX) (Reik et al., 2001). Ces modifications épigénétiques stabilisent l'expression des gènes au cours du développement et sont transmises aux cellules en division. L'ajout d'un groupe méthyle au niveau du promoteur d'un gène empêche généralement sa transcription (Robertson and Jones, 2000) tandis que l'ICX est le processus par lequel un des deux chromosomes X de la femme devient transcriptionnellement inactif dans toutes les cellules somatiques (Avner and Heard, 2001). Le but de ce mécanisme de compensation de dose entre les chromosomes sexuels est d'égaliser les gènes liés au chromosome X, entre les femmes XX et les hommes XY.

Il existe deux grands cycles de reprogrammation épigénétique du génome : pendant le développement préimplantatoire précoce (Figure 13) et pendant le développement des cellules germinales (Figure 14).

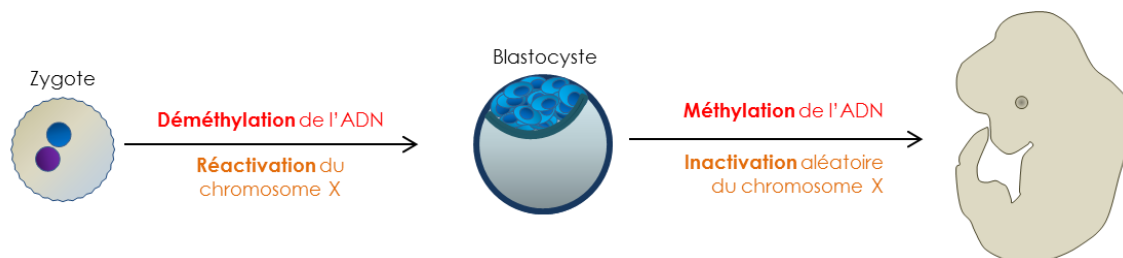


Figure 13: Reprogrammation naturelle observée pendant le développement préimplantatoire précoce. La déméthylation/méthylation permet de remettre l'état de méthylation des gènes à zéro, nécessaire à la pluripotence des cellules de l'ICM. L'activation/inactivation du chromosome X chez la femme est un mécanisme de compensation dose dépendant des gènes. Adapté de Cantone and Fisher, 2013.

Après la fécondation, les génomes maternel et paternel sont successivement déméthylés-reméthylés, à l'exception de certaines régions correspondant aux gènes de l'empreinte parentale¹¹ (Ferguson-Smith and Surani, 2001). Ce cycle de reprogrammation est requis pour la totipotence des cellules du nouvel embryon. Après la fécondation, le chromosome X inactif est réactivé et correspond à l'état pluripotent des cellules hES (Lengner et al., 2010). Ensuite, pendant le développement embryonnaire précoce chez la femme, un des deux chromosomes X passe d'un état actif (euchromatique) à un état inactif (hétérochromatique) (van den Berg et al., 2009). Cette inactivation chromosomique qui résulte d'une longue série d'événements moléculaires complexes (revus par Augui et al, 2011), reste stable et héritée de façon clonale au cours des divisions cellulaires ultérieures (van den Berg et al., 2009).

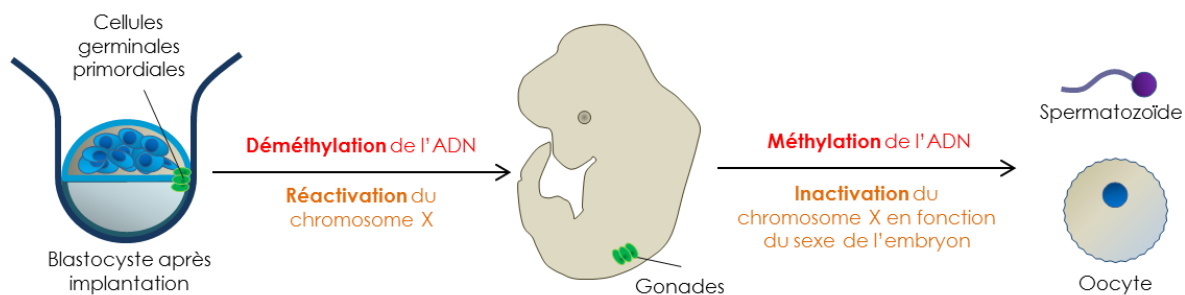


Figure 14: Reprogrammation naturelle des cellules germinales. La déméthylation/méthylation permet de remettre l'état de méthylation des gènes à zéro et participe au maintien de l'empreinte parentale. L'activation/inactivation du chromosome X se fait en fonction du sexe de l'embryon. Adapté de Cantone and Fisher, 2013.

Le deuxième cycle de reprogrammation naturelle se déroule pendant le développement des cellules germinales. Après la fécondation, quelques cellules du nouvel embryon migrent de l'épiblaste pour former la lignée germinale (Figure 14, en vert). Pendant la gamétogenèse, les méthylations de l'ADN et l'ICX des cellules germinales primordiales¹² doivent être effacées et remodelées sur base du sexe de l'embryon. Le chromosome inactif chez la femme est réactivé dans les cellules germinales primordiales en formation.

¹¹ Empreinte parentale : un gène soumis à empreinte est un gène dont l'expression est différente pour les deux allèles de ce gène porté par un même individu. Alors que la plupart des gènes sont actifs ou inactifs de la même façon pour leurs deux allèles, certains nécessitent que l'une des copies parentales soit réprimée, l'autre pouvant être exprimée. Cette répression génique s'appelle l'empreinte parentale et pour le mode d'expression de chacune des copies n'est pas aléatoire mais dépend de leur origine (maternelle ou paternelle).

¹² Cellules germinales primordiales : elles constituent l'origine commune des spermatozoïdes et des ovules et donc de la lignée germinale. Elles apparaissent à la deuxième semaine dans l'épiblaste de l'embryon humain.

- Reprogrammation induite

La reprogrammation peut aussi être induite de manière artificielle par l'introduction de facteurs exogènes. La première personne à avoir démontré, avec succès, qu'il était possible d'induire une reprogrammation cellulaire est le Dr. Gurdon.

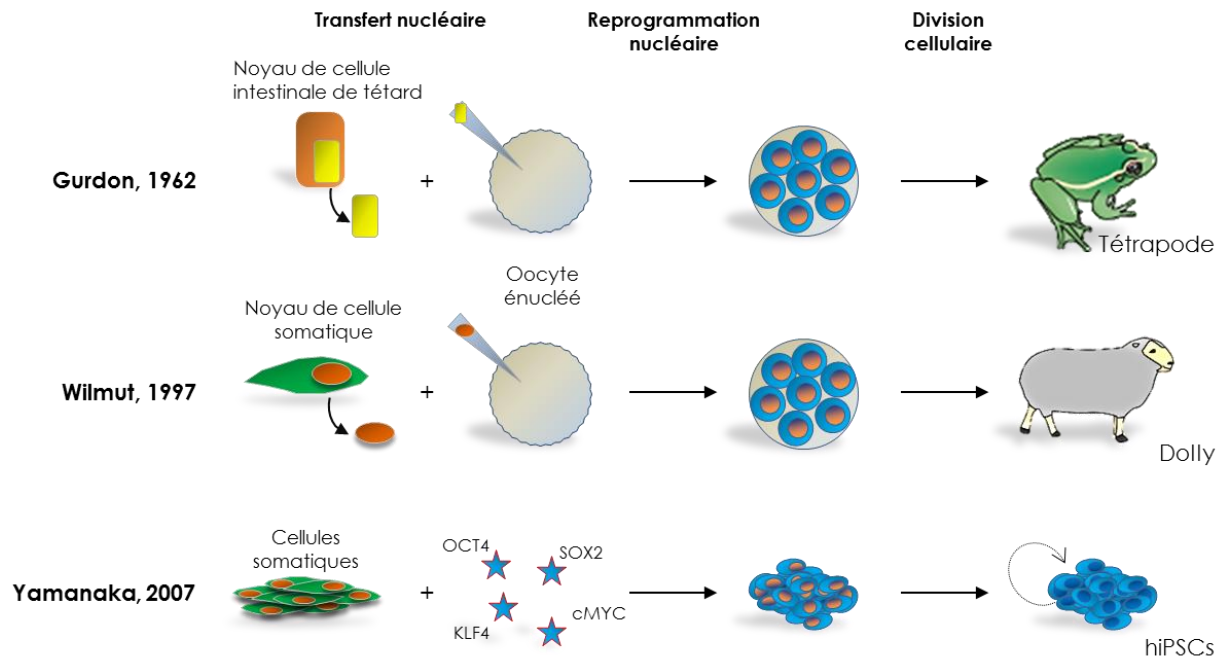


Figure 15: Historique de la reprogrammation artificielle. En 1962, le Dr Gurdon transfère le noyau de cellule embryonnaire intestinale de têtard dans un oocyte énucléé prouvant ainsi pour la première fois la processus de reprogrammation. En 1997, la technique de transfert nucléaire de cellule somatique est appliquée pour la première fois aux vertébrés par le Dr Wilmut. Enfin, en 2007, le Dr Yamanaka reprogramme pour la première fois des fibroblastes humains en cellules hiPS. Adapté de Pasque et al., 2011.

En effet, il a démontré que des cellules somatiques différenciées (*i.e.* des cellules intestinales de têtard) peuvent être reprogrammées en un état embryonnaire (Gurdon, 1962) suite au transfert de leur noyau dans des œufs énucléés de grenouille (Figure 15). Ces résultats prouvent qu'un ovocyte est capable de reprogrammer un noyau de cellule différenciée en noyau embryonnaire pouvant générer un nouvel organisme (Hochedlinger and Jaenisch, 2006). La technique de reprogrammation par transfert nucléaire de cellule somatique (SCNT pour « Somatic Cell Nuclear Transfer ») est adaptée pour la première fois aux mammifères en 1997 par le Dr. Wilmut. Il réussit à cloner une brebis donnant naissance à « Dolly » (Wilmut et al., 2007). Le Dr. Yamanaka a été le premier à démontrer que la reprogrammation par SCNT découverte par Sir John Gurdon, peut être reproduite artificiellement, sans recours à des ovocytes, par l'introduction

de facteurs exogènes dans une cellule différenciée. Au milieu des années 2000, sachant qu'il existe des cellules indifférenciées dans tout individu adulte, son équipe se lance à la découverte des gènes qui en sont responsables. Après avoir choisi 24 d'entre eux, il met au point un cocktail de quatre gènes dont l'expression suffit à maintenir une cellule dans un état indifférencié (Takahashi and Yamanaka, 2006). A l'aide de particules virales codant pour les 4 facteurs ainsi identifiés : **OCT4**, **SOX2**, **KLF4** et **c-MYC** (OSKM), il réussit à reprogrammer *in vitro* pour la première fois des fibroblastes humains en cellules hiPS (Takahashi et al., 2007). Parmi ces quatre facteurs, OCT4 et SOX2 sont les principaux régulateurs de la pluripotence des cellules hES comme présenté plus haut (voir 1.4. *Propriétés des hES*). Les facteurs Krüppel-like (KLFs) sont des facteurs de transcription - à domaines de liaison à l'ADN en « doigts de zinc » - qui régulent la prolifération, la différenciation, le développement et la mort cellulaire programmée (Beth et al., 2010 ; McConnell et al., 2007). Les domaines à doigts de zinc de la famille KLF lient préférentiellement les séquences contenant le motif CACCC (McConnell and Yang, 2010) Pearson et al., 2008). Le complexe OCT4/SOX2 et KLF4 lient le promoteur de NANOG et induisent son expression (Zhang et al., 2010). OSK lient également leur propre promoteur et les régions régulatrices les unes des autres ainsi que celles de nombreux gènes spécifiques des hES tels que ESRRB, KLF2, SALL4, et ZFP42 et des régulateurs des voies de signalisation tels que SMAD1 et STAT3 (Boyer et al., 2006; Jiang et al., 2008; Loh et al., 2006; Sridharan et al., 2009) (Figure 16).

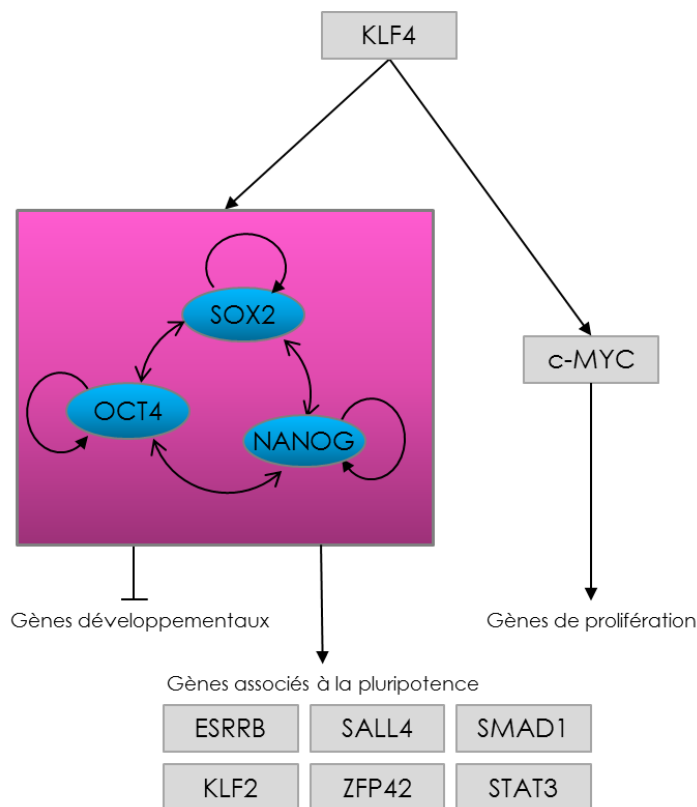


Figure 16: Rôle transcriptionnel des facteurs de reprogrammation (OSKM) et NANOG dans le réseau de pluripotence. KLF4 et c-MYC sont dispensables à ce réseau. Adapté de McConnell and Yang, 2010.

Les proto-oncogènes MYC encodent une famille de facteurs de transcription contenant un domaine de liaison à l'ADN à motif hélice-boucle-hélice basique (bHLH) et un domaine « *leucine zipper* » ou bZIP. Les 3 principaux membres de cette famille (c-MYC, n-MYC et l-MYC) régulent de nombreux gènes impliqués dans des processus cellulaires fondamentaux tels que la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Meyer and Penn, 2008). Surexprimés ou mutés, les gènes MYC sont impliqués dans la grande majorité des cancers chez l'homme. n-MYC et c-MYC sont exprimés dans les cellules hES indifférenciées et leur expression diminue progressivement avec la différenciation (Sumi et al., 2007). c-MYC est un facteur de reprogrammation à part ne faisant pas partie du réseau principal du maintien de la pluripotence (Chen et al., 2008) (Figure 16) et n'étant pas strictement nécessaire à la reprogrammation des hiPS (Nakagawa et al., 2008; Wernig et al., 2008). Contrairement à OSK, c-MYC n'est pas responsable d'effets ON/OFF sur ses gènes cibles (Nie et al., 2012). OSK sont cruciaux pour induire le changement de destin cellulaire lors de la reprogrammation, tandis que c-MYC semble agir en amplifiant les changements d'expression des gènes ciblés par ces facteurs (Papp and Plath,

2013). Les facteurs c-MYC et KLF4 sont des proto-oncogènes qui handicapent l'utilisation de ces cellules reprogrammées pour des applications en médecine régénérative. En effet, ils augmentent le risque potentiel de formation de tumeur après transplantation (Okita et al., 2010) (Tong et al., 2011). En 2007, l'équipe du Dr. Thomson a développé une stratégie de reprogrammation comparable à celle de Yamanaka dans laquelle KLF4 et c-MYC sont remplacés par le facteur de transcription NANOG et LIN28, une protéine de liaison aux ARNm (Yu et al., 2007). En 2008, l'équipe du Dr. Melton réussit à reprogrammer des fibroblastes humains avec les seuls facteurs de transcription OCT4 et SOX2, en présence d'acide valproïque (VPA pour « valproic acid ») (Huangfu et al., 2008). L'utilisation de petites molécules telles que le VPA, un inhibiteur d'histone désacétylase, mais aussi la 5-Azacytidine (5-Aza), un inhibiteur d'ADN méthyltransférase, augmente drastiquement (100x) l'efficacité du processus de reprogrammation (Huangfu et al., 2008 ; Kim et al., 2011 ; Ohi et al., 2011).

Si les cellules hiPS ont été générées à partir de fibroblastes de peau, depuis 2008, elles peuvent également être produites à partir de cellules somatiques de nombreux tissus tels que le foie (Aoi et al., 2008), l'estomac (Aoi et al., 2008), le pancréas (Stadtfield et al., 2008a), les intestins (Wernig et al., 2008) ou le sang (Hanna et al., 2007), en utilisant différentes combinaisons des facteurs OCT4, SOX2, KLF4, cMYC, NANOG et LIN28 (Yu et al., 2007 ; Si-Tayeb et al., 2010).

2.2 Systèmes de délivrance des gènes dans la cellule

Méthodes de reprogrammation	Types cellulaires	Facteurs	Efficacité	Avantages/Désavantages	Références	
Intégratif	Rétrovirus	OSKM OSK OSK+VPA OS+VPA	0,001-1%	Relativement efficace	Intégration génomique, transgènes pas totalement éteints	Takahashi et al, 2007 Lowry et al, 2007 Huangfu et al, 2008 Nakagawa et al, 2008
	Lentivirus	OSKM miR302/367+VPA	0,1-1%	Relativement efficace, infecte toutes les cellules (en division ou non)	Intégration génomique, transgènes pas totalement éteints	Yu et al, 2007 Stadtfield et al, 2008 Sommer, et al 2009 Anokye-Danso et al, 2011
	Lentivirus inducible par la DOX	OSKM OSKMN	0,1-2%	Relativement efficace, permet le contrôle de l'expression des transgènes	Intégration génomique, nécessite d'être induit par un activateur	Maherali et al, 2008
Intégration transitoire	Transposon	OSKM	0,1%	Relativement efficace, pas d'intégration génomique	Criblage laborieux des lignées excisées	Wolffjen et al, 2009
	Lentivirus-LoxP	OSK	0,1-1%	Relativement efficace, pas d'intégration génomique	Criblage laborieux des lignées excisées, les sites LoxP persistent	Somers et al, 2010
Non intégratif	Adénovirus	OSKM	0,001%	Pas d'intégration génomique	Faible efficacité	Stadtfield et al, 2008 Zhou et al, 2009
	Episomes	OSNL	0,001%	Pas d'intégration génomique	Faible efficacité, rare intégration génomique du vecteur	Si-Tayebe et al, 2010
Sans ADN	Virus Sendai	OKSM	1%	Pas d'intégration génomique et pas d'ADN	Les particules virales disparaissent lentement	Fusaki et al, 2009
	Protéines	OS	0,001%	Pas d'intégration génomique, délivraison directe des facteurs, pas d'ADN	Faible efficacité, courte demi-vie, requiert un traitement répété avec de grande quantité de protéines pures	Kim et al, 2009
	ARNm	OSKM OSKML+VPA	1-4%	Très efficace, pas d'intégration génomique, pas d'ADN, cinétique de reprogrammation plus rapide	Requiert plusieurs transfections successives, manipulation d'ARN	Warren et al, 2010
	miARN	miR200c, miR302s miR369	0,1%	Relativement efficace, pas d'intégration génomique, cinétique de reprogrammation plus rapide	Faible efficacité, manipulation d'ARN	Miyoshi et al, 2011

Tableau 1: Méthodes de reprogrammation en cellules hiPS.

Les cellules hiPS ont été initialement générées par transduction de particules rétrovirales (qui infectent uniquement les cellules en division) (Takahashi et al., 2007) ou lentivirales (capables d'infecter toutes les cellules) (Yu et al., 2007) codant pour chacun des facteurs de transcription séparément (Tableau 1). Bien que ces méthodes de reprogrammation virale aient l'avantage d'offrir une bonne efficacité (entre 0,001% et 1%), elles présentent l'inconvénient majeur de s'intégrer de manière stable dans le génome hôte ; ceci pouvant conduire à une expression prolongée ou à la mutation du transgène. Plusieurs méthodes alternatives basées sur l'utilisation de vecteurs à intégration transitoire (dont l'excision peut être induite une fois la reprogrammation achevée), ont été développées (Somers et al., 2010; Woltjen et al., 2009). Par exemple, l'équipe du Dr. Nagy a mis au point une autre stratégie basée sur l'intégration transitoire du transposon PiggyBac (PB), un élément génétique mobile qui transpose efficacement des séquences entre un gène et un vecteur par un mécanisme de « couper-coller » (Woltjen et al., 2009). Le système transposon/transposase PB nécessite un vecteur contenant des répétitions terminales inversées (le transposon) de part et d'autre du transgène et un vecteur permettant l'expression inductible transitoire de l'enzyme transposase qui catalyse l'insertion ou l'excision du transgène. Une fois la reprogrammation effectuée, le transposon est excisé précisément par induction de la transposase. Pour obtenir des cellules hiPS sans danger d'intégration, des vecteurs non intégratifs sont également utilisés tels que des adénovirus (Stadtfield et al., 2008b; Zhou and Freed, 2009) ou des épisomes (Si-Tayeb et al., 2010; Yu et al., 2009). La reprogrammation par transfection d'épisome a été développée par l'équipe du Dr. James Thomson (Yu et al., 2009). Un épisome est un plasmide qui contient des séquences dérivées du virus Epstein-Barr qui lui permettent de se répliquer de manière autonome dans la cellule hôte (contrairement à un plasmide classique). L'efficacité de la reprogrammation par adénovirus et épisome est significativement réduite par rapport aux autres agents de transduction (de l'ordre de 0.0001%) et la réactivation des principaux marqueurs de pluripotence prend plus de temps. Enfin, des méthodes basées utilisant des vecteurs sans ADN ont également été développées pour générer des cellules hiPS : le virus Sendai (SeV pour « Sendai virus ») à ARN (Fusaki et al., 2009), et la transfection d'ARNm (Miyoshi et al., 2011; Warren et al., 2010) ou de protéines (Kim et al., 2009). Le génome du SeV se réplique sous forme d'ARN simple brin qui est ensuite traduit en protéine dans le cytoplasme des cellules infectées. Le vecteur ne passe pas par une phase d'ADN et ne s'intègre pas dans le

génomique de l'hôte (Lamb and Kolakofsky, 2001, Lippincott Williams & Wilkins, New York). Ce vecteur est très efficace (approximativement 1% d'efficacité) pour introduire des gènes étrangers et peut infecter de nombreux types cellulaires (Tokusumi et al., 2002). Des études plus récentes décrivent plusieurs méthodes de reprogrammation basées sur la transfection de protéines (Kim et al., 2009) ou d'ARNm (Warren et al., 2010 ; Miyoshi et al., 2011) pour générer des hiPS potentiellement utilisables en clinique. La reprogrammation à l'aide d'ARNm est de loin la technique de génération de cellules hiPS la plus efficace (plus de 4% d'efficacité) mais en raison de la demi-vie très courte des ARNm, des transfusions quotidiennes sont nécessaires pour induire les cellules hiPS. Récemment, le Dr. Deng et son équipe ont montré que des cellules iPS de souris peuvent être générées à partir de cellules somatiques murines par le traitement combiné de 7 petites molécules synthétiques (VPA et tranylcypromine, des régulateurs épigénétiques ; 2-méthyl-5-hydroxytryptamine, un agoniste de neurotransmetteur ; forskolin, un agoniste de l'AMPc, et CHIR99021, 616452 et D4476, des inhibiteurs des voies de signalisation WNT et TGFbeta) (Hou et al., 2013). Cette méthode n'a pas encore été appliquée à l'homme. Les reprogrammations par SeV, épisode et ARNm sont les plus répandues et les plus communément utilisées pour générer des cellules hiPS de bonne qualité (Schlaeger et al., 2015). Contrairement aux traditionnelles méthodes virales ou intégratives, les reprogrammations par épisode et ARNm peuvent être utilisées pour générer des hiPS sans risque d'intégration et utilisables en clinique.

2.3 Le processus de la reprogrammation

L'acquisition de la pluripotence induite est un processus lent (plusieurs semaines) et inefficace (Stadtfield and Hochedlinger, 2010; Yamanaka, 2009a), indiquant que les acteurs de la reprogrammation doivent surmonter une série de barrières épigénétiques qui ont été posées progressivement sur le génome au cours de la différenciation et qui stabilisent l'identité de la cellule empêchant ainsi toute modification aberrante du destin cellulaire. La science de la reprogrammation reste encore mal comprise et la majorité des études à l'heure actuelle sont focalisées sur la compréhension de ce mécanisme et son efficacité (Vallier et al., 2009; Doege et al., 2012). Au cours de la reprogrammation, il apparaît une diminution de l'expression des gènes spécifiques des cellules somatiques accompagnée par l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le maintien de la pluripotence suivie par la réactivation de l'activité télomérase (Samavarchi-Tehrani et al., 2010). Ce processus peut être divisé en trois phases : la phase

d'initiation (précoce), la phase de maturation (intermédiaire) et la phase de stabilisation (tardive) (David and Polo, 2014) (Figure 19).

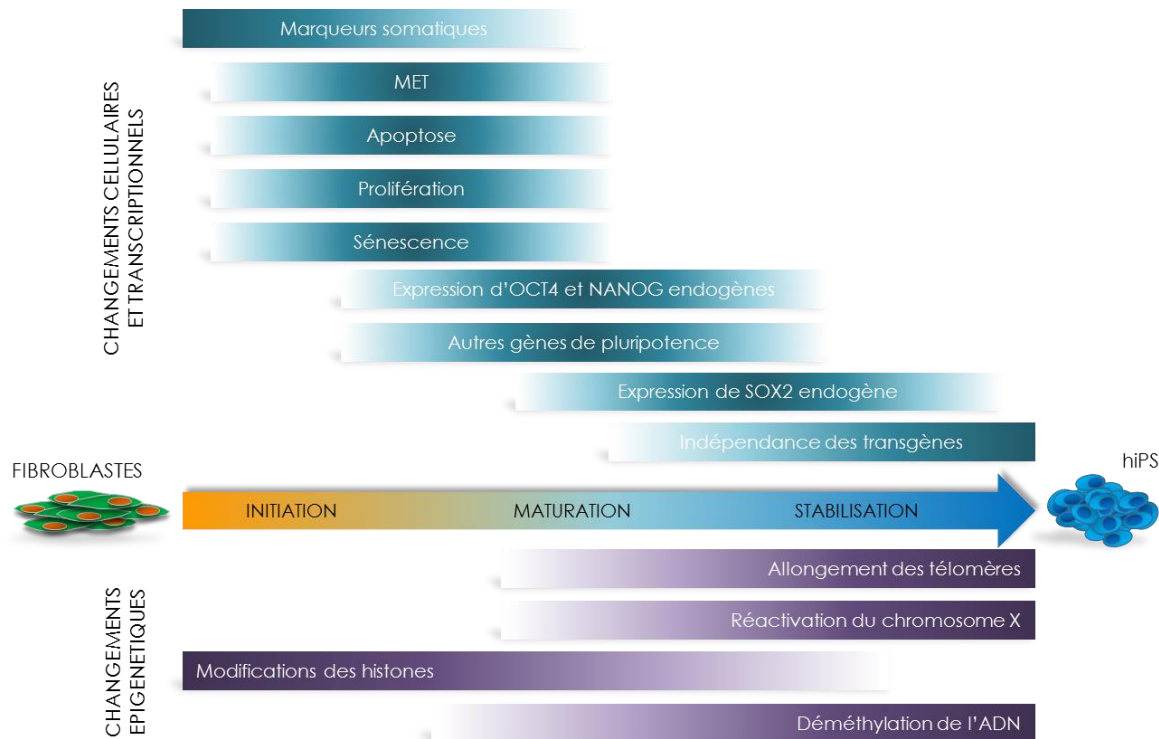


Figure 17: Changements épigénétiques et cellulaires observés durant la reprogrammation de fibroblastes en cellules hiPS. Les événements successifs sont divisés en trois phases : la phase d'initiation (précoce), la phase de maturation (intermédiaire) et la phase de stabilisation. Il apparaît tout d'abord une diminution de l'expression des gènes spécifiques des cellules somatiques accompagnée d'apoptose massive et de sénescence, suivie par l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le maintien de la pluripotence et l'indépendance de ceux-ci vis-à-vis des transgènes. Les grands changements épigénétiques apparaissent en dernier lors de la phase de stabilisation. Adapté de David and Polo, 2014.

La phase d'initiation correspond aux changements morphologiques. Les fibroblastes subissent une transition mésenchymato-épithéliale (Samavarchi-Tehrani et al., 2010). D'un point de vue moléculaire, ce remodelage est caractérisé par la perte des marqueurs fibroblastiques comme par exemple THY1, CD44 ou le facteur de transcription SNAI1/2 (Stadtfeld and Hochedlinger, 2010) (Brambrink et al., 2008; Hansson et al., 2012) (Polo et al., 2012), et l'acquisition de marqueurs épithéliaux tels que CDH1, EpCam ou la famille des miARN-200 Samavarchi-Tehrani et al., 2010). Plusieurs équipes ont montré que les propriétés caractéristiques des cellules hES telles que la prolifération, résistance à l'apoptose et à la sénescence sont induites en cascade par l'expression des facteurs de reprogrammation lors de cette phase précoce (Marion et al., 2009a; Mikkelsen et al., 2008; Utikal et al., 2009). Dès les premiers jours suivant l'introduction des

transgènes, un stress oxydatif, de la sénescence (arrêt définitif du cycle cellulaire) et de l'apoptose (mort programmée) se produisent contribuant à la faible efficacité de production de cellules hiPS (Figure 18) (Papp and Plath, 2011; Papp and Plath, 2013).

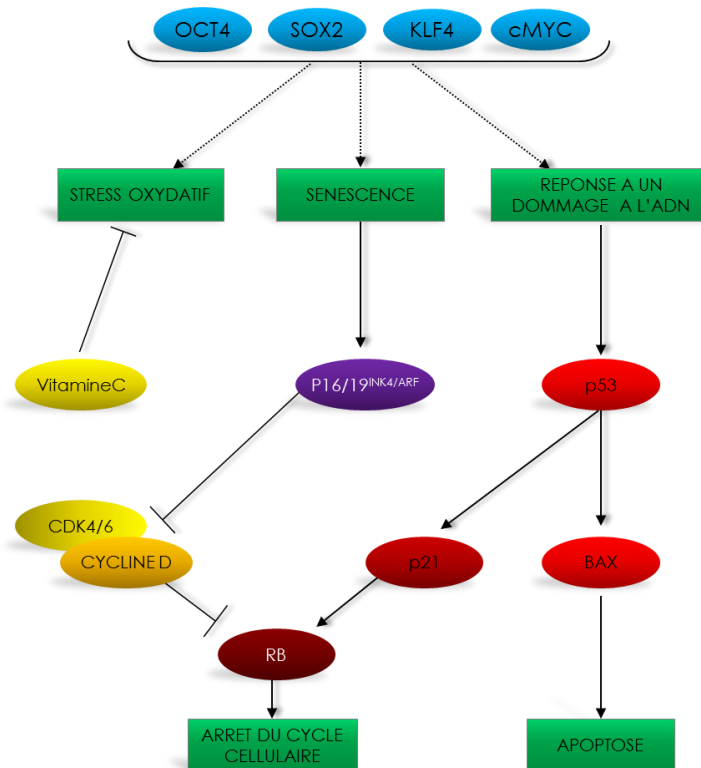


Figure 18: Induction de l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire lors de la reprogrammation. La protéine p53 joue un rôle important en induisant la mort par apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire. La reprogrammation est un processus stressant associé à la production de stress oxydatif, à la sénescence et à des dommages à l'ADN. Suite aux dommages à l'ADN p53 est activée et induit d'une part les protéines pro apoptotiques BAX et à la mort par apoptose, et d'autre part, p21 qui engendre l'arrêt du cycle cellulaire via la protéine de rétinoblastome RB. La sénescence active p16/19 qui inhibe à son tour le cycle cellulaire. L'ajout de vitamine C lors de la reprogrammation peut empêcher le stress oxydatif. Adapté de Cheung et al., 2012.

Le traitement des cellules par de la vitamine C, un antioxydant, facilite la formation des cellules hiPS en piégeant les espèces réactives de l'oxygène (ROS pour « reactive oxygen species ») (Esteban et al., 2010). La reprogrammation induit de la sénescence cellulaire conduisant à l'expression de p16/p19^{INK4/ARF} (Banito et al, 2009). L'induction de ces protéines qui inhibent les kinases cycline-dépendante (CDKs), conduit à la phosphorylation de Rb (la protéine de rétinoblastome). La forme phosphorylée de Rb, pRb, bloque les facteurs E2F indispensables à la progression du cycle cellulaire entraînant l'arrêt définitif du cycle cellulaire (Hawkins et al, 2014). L'introduction des transgènes engendre également des dommages à l'ADN qui aboutissent aussi à un arrêt du cycle cellulaire et à de l'apoptose (Li et al, 2010 ; Zhang et al, 2013). La

protéine p53 aussi appelée « protéine suppresseur de tumeur », encodée par le gène *TP53* chez l'homme, joue un rôle central dans ces processus (Cheung et al., 2012). Par exemple, dans le cas de dommages à l'ADN, p53 empêche les cellules de proliférer de manière incontrôlée (Hong et al., 2009) en induisant l'expression de p21^{CIP1} (un inhibiteur de CDK), ou en conduisant à de l'apoptose, suite à l'activation de deux protéines pro-apoptotiques Bax et Bak. Dès lors, p53 agit comme un obstacle au processus de reprogrammation. La diminution de l'expression de *TP53*, notamment par siARN, dans des fibroblastes humains, augmente drastiquement l'efficacité de la reprogrammation (100x) (Hong et al., 2009; Kawamura et al., 2009; Marion et al., 2009). Cependant, sa suppression totale ouvre la porte à la génération de cellules instables génomiquement (Marion et al., 2009a).

Ensuite, la phase de maturation correspond à la vague des grands changements transcriptionnels marqués par l'apparition progressive de l'expression des premiers gènes de pluripotence endogènes tels que OCT4 et NANOG (Hansson et al., 2012; Polo et al., 2012; Samavarchi-Tehrani et al., 2010). A la toute fin de la phase de maturation, il est possible de détecter l'expression de SOX2 endogène (Buganim et al., 2012; Samavarchi-Tehrani et al., 2010; Stadtfeld et al., 2010). Une autre caractéristique importante de la fin de cette phase est l'extinction progressive de l'expression des transgènes (Golipour et al., 2012). Les cellules reprogrammées sont capables de proliférer indépendamment des transgènes.

La phase de stabilisation englobe les changements épigénétiques observés lors de la reprogrammation naturelle qui se produit chez le zygote (voir *Reprogrammation naturelle*). Les télomères sont rallongés à leur niveau embryonnaire (Marion et al., 2009b; Stadtfeld et al., 2010) et le chromosome X inactif des cellules somatiques femelles est réactivé (même si, chez l'humain, cette réactivation se produit moins fréquemment) (Stadtfeld et al., 2008 ; Papp and Plath, 2013). Les méthylations de l'ADN sont supprimées (Bhutani et al., 2010; Kumar et al., 2013). Ces groupes méthyles qui influencent la transcription des gènes reflètent la mémoire épigénétique du type de cellule somatique d'origine. Il a été montré que ce phénomène de « mémoire épigénétique » peut perturber la différenciation ultérieure des cellules hiPS vers le type cellulaire somatique d'origine (Bar-Nur et al., 2011; Marchetto et al., 2009).

La reprogrammation est un processus lent et caractérisé par une mort cellulaire et une sénescence importante durant la phase initiale et par une grande proportion de cellules incomplètement

reprogrammées à la fin de la phase de maturation qui peut se traduire par une altération de la différenciation des cellules iPS dans le type cellulaire souhaité (Hanna et al., 2009).

L'expression des facteurs exogènes est indispensable à la reprogrammation pendant un laps de temps défini dépendant des vecteurs et de la méthode utilisés (de 5 à 15 jours chez l'homme). Ensuite, les cellules se maintiennent dans un état pluripotent indépendamment des facteurs de reprogrammation, indiquant une conversion stable (Stadtfeld et al., 2008). Une reprogrammation incomplète peut entraîner une altération de la capacité à se différencier et augmenter le risque de formation de tératome après une éventuelle transplantation (Lister et al., 2011; Ohi et al., 2011; Stadtfeld et al., 2010).

2.4 Propriétés des cellules hiPS

Les hiPSCs générées sont hautement similaires aux hESCs d'un point de vue morphologique, moléculaire et fonctionnel (Laslett et al., 2003; Maherali et al., 2007; Mikkelsen et al., 2007) (Okita et al., 2007). Bien que certaines études aient montré des différences entre les cellules hES et hiPS, d'autres - basées sur un plus large échantillonnage - ont montré que les différences observées sont principalement dues à la méthode utilisée pour les générer (Yamanaka, 2009b). Au niveau morphologique, il est impossible de différencier les cellules hES des hiPS. Elles se présentent sous forme de colonie et possèdent toutes deux un gros noyau et un cytoplasme restreint (voir *1.4 propriétés des hES*). Les hiPS expriment les mêmes marqueurs spécifiques de cellules hES tels que les antigènes de surface SSEA-3, SSEA-4, de tumeur TRA-1-60, TRA-1-81 et les facteurs de pluripotence NANOG, OCT4 et SOX2. Elles présentent également une activité télomérase élevée et peuvent proliférer indéfiniment dans un état indifférencié (Yu et al., 2007 ; Lee et al., 2009 ; Kim et al., 2013). De plus, les hiPS sont pluripotentes : elles peuvent se différencier en tous les types cellulaires de l'organisme provenant des 3 feuillets embryonnaires (Yu et al., 2007 ; Lee et al., 2009 ; Kim et al., 2013). Elles peuvent également générer des tératomes comprenant les 3 feuillets embryonnaires, après injection dans des souris immunodéficientes. Cependant, il n'existe pas encore de test *in vivo* standardisé, adapté aux cellules hiPS. En effet, il n'est pas possible de tester *in vivo* leur implication fonctionnelle dans le développement embryonnaire et la pluripotence en générant des chimères humaines (Boland et al., 2009; Zhao et al., 2009).

2.5 Challenges et applications thérapeutiques

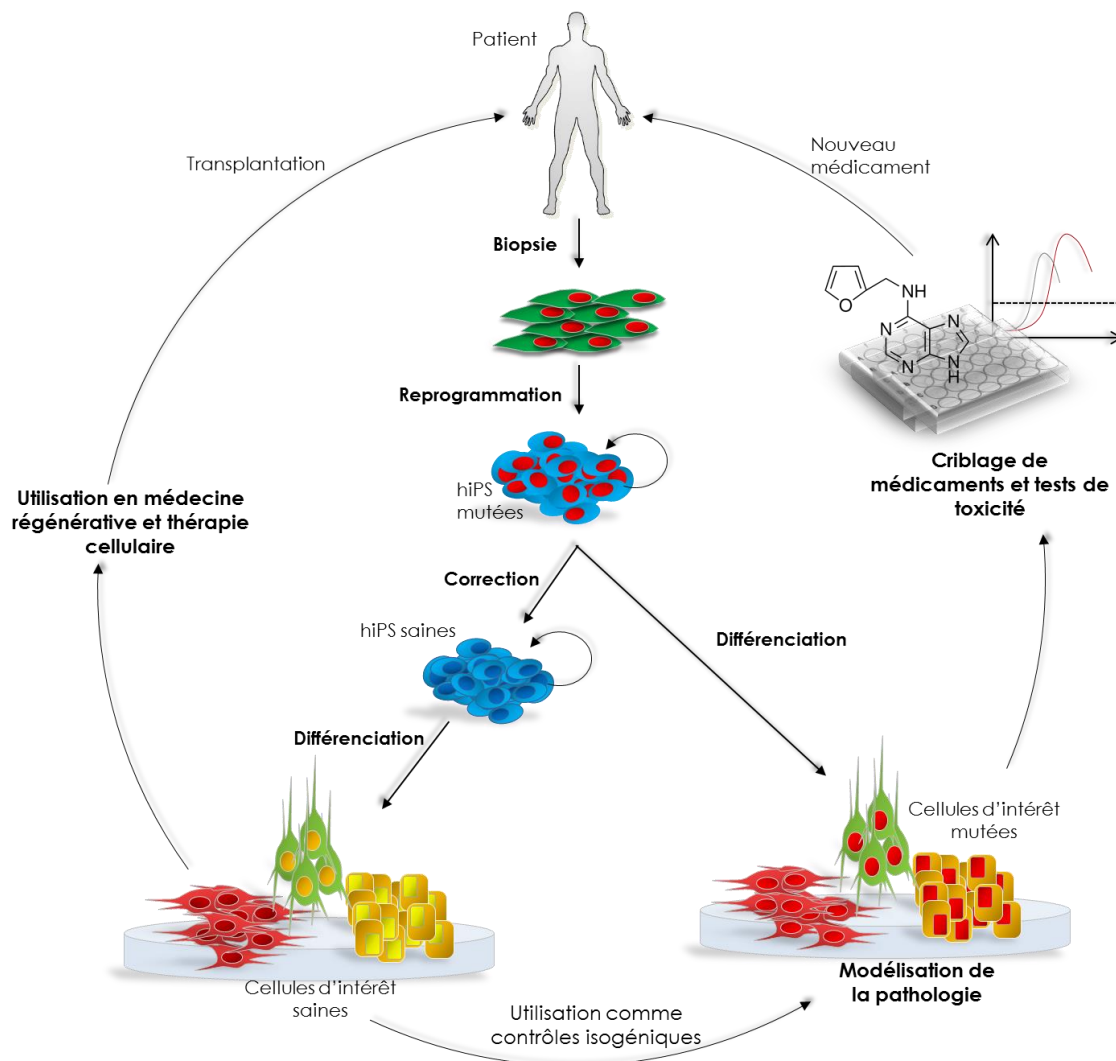


Figure 19: Challenges et applications thérapeutiques des cellules hiPS. La génération d'hiPS à partir de patients et la correction du génome de ces hiPS par la technologie de l'édition du génome (voir 3. *L'édition du génome ou genome editing*) ouvre la porte à leur utilisation thérapeutique. La différenciation des cellules hiPS en cellules d'intérêt permet la modélisation de pathologie, le criblage de médicaments et le développement de tests de toxicité avant une entrée en phase clinique.

En plus d'être un outil de recherche passionnant pour l'étude du développement précoce et de la reprogrammation épigénétique naturelle, les cellules hiPSCs ont un potentiel thérapeutique énorme (Figure 19). Comme elles possèdent des propriétés semblables aux cellules hES - sans les questions éthiques - les cellules hiPS, constituent théoriquement une réserve inépuisable de n'importe quelle cellule différenciée du corps humain et ouvrent de nouvelles portes à la médecine régénérative. Malgré la complexité du processus, générer des cellules hiPS provenant de patients et de maladies génétiques spécifiques est devenu presque routinier aujourd'hui (Lee et

al., 2009; Park et al., 2008). Au cours des dernières années, le nombre de publications de modélisation et essais thérapeutiques à partir de cellules iPS a régulièrement augmenté, témoignant de la grande influence de cette technologie de pointe (Robinton and Daley, 2012). Les cellules hiPS permettent l'étude mécanistique et la modélisation de nombreuses maladies génétiques, le criblage de molécules synthétiques et de médicaments *in vitro*, et l'évaluation du potentiel thérapeutique de la thérapie cellulaire et de la réparation des gènes. Ces cellules permettent d'envisager des essais précliniques (pharmacologiques ou toxicologiques) beaucoup plus prédictifs qu'à l'heure actuelle. De plus, elles peuvent prochainement révolutionner la médecine régénérative.

2.5.1 Cellules hiPS et essais précliniques

L'intérêt des cellules hiPS est lié à la possibilité de modélisation de maladies humaines et à la possibilité de disposer d'un modèle *in vitro* dont les résultats devraient être plus facilement transposables à l'homme que ceux obtenus chez les rongeurs. En effet, à l'heure actuelle, environ 70% des molécules testées chez l'animal en phase préclinique échoueront en phase clinique.

A partir de fibroblastes de patients atteints de maladies génétiques, il est possible de mieux comprendre les mécanismes moléculaires aboutissant à cette pathologie et de disposer d'un modèle préclinique plus proche de la pathologie humaine et de la clinique (Figure 19). Ainsi, à titre d'exemple, des cellules hiPS ont été générées à partir de fibroblastes de patients atteints de dysautonomie familiale, une maladie autosomique récessive touchant les systèmes nerveux périphériques et autonomes et causée par la mutation du gène codant pour *IKBKAP*, une protéine impliquée dans l'élongation de la transcription (Lee et al., 2009). Ces hiPS « pathologiques » ont ensuite été différenciées en neurones et comparées à des cellules de patients sains. L'équipe du Dr. Studer a ainsi montré que ces cellules iPS présentaient des défauts qui miment parfaitement les défauts observés chez l'homme, comme par exemple une expression d'*IKBKAP* diminuée, une différenciation neuronale perturbée et une migration neuronale anormale (Lee et al., 2009). Depuis, de nombreuses autres maladies génétiques neurodégénératives (Israel et al., 2012; Mitne-Neto et al., 2011; Soldner et al., 2009), cardiovasculaires (Itzhaki et al., 2011; Lahti et al., 2012; Matsa et al., 2011), métaboliques (Park et al., 2008) ou immunitaires (Raya et al., 2009) ont été modélisées avec plus ou moins de succès. En effet, il peut être difficile de récapituler de manière fidèle tous les symptômes de la maladie puisque les effets du vieillissement sur le corps ne

peuvent pas être induits en culture *in vitro*. Enfin, les cellules différenciées à partir de cellules hiPS sont généralement immatures (Koehler et al., 2013; Oshima et al., 2010). Les cellules peuvent avoir besoin de vieillir et d'atteindre un état de différenciation terminale pour que les phénotypes pathologiques deviennent évidents (Dambrot et al., 2011), sauf si le gène muté est exprimé dans les cellules immatures. De plus, de nombreuses maladies peuvent impliquer des interactions entre différents types cellulaires de l'organisme, ce qui est également difficile à reproduire *in vitro*. Pour ces maladies cellulaires non-autonomes, il sera nécessaire d'induire la différenciation en plusieurs types cellulaires pour observer les symptômes *in vitro*.

Ces modèles cellulaires humains peuvent également servir de modèles de base pour les études toxicologiques nécessaires à la commercialisation d'un nouveau médicament (Hughes et al., 2011). La prédiction précoce du risque de nouveaux médicaments peut réduire les coûts mais peut aussi conduire à l'arrêt prématuré du développement du médicament si une sensibilité accrue des cellules humaines en réaction à une molécule d'intérêt, est mise à jour. Par exemple, dans le traitement de pathologies cardiaques, l'induction d'arythmies est un des principaux risques engendrés par un nouveau médicament (Lu et al., 2008; Shah and Swerdlow, 2010). Ainsi, le Dr. Mummery et son équipe ont appliqué 11 molécules sur des cardiomyocytes humains (« spontaneously beating cardiomyocytes ») dérivés de cellules hiPS (Braam et al., 2013). Alors que la majorité ont montré un effet prévisible, deux composés ont montré un effet secondaire important non prédit par un test de toxicité classiquement utilisé (Braam et al., 2013). Il est clair également que disposer d'un modèle humain plutôt que d'un modèle murin permettra de prédire de manière plus spécifique un effet secondaire ou une toxicité rhédibitoire. De plus, beaucoup de médicaments ont des modes d'action et des efficacités différents chez les rongeurs et chez l'homme (Gordon et al., 2007; Lees et al., 2003).

Les cellules hiPS constituent également un modèle de choix pour le criblage de nouveaux médicaments. Grâce au modèle humain de dysautonomie familiale (décrit plus haut), l'équipe du Dr. Studer a identifié la kinétine comme potentiel traitement (Lee et al., 2009).

2.5.2 Cellules hiPS et médecine régénérative

Afin de pouvoir utiliser les cellules dérivées des hiPS en médecine régénérative humaine, certaines étapes clés doivent encore être franchies (Tabar and Studer, 2014). Par exemple, il faudra pouvoir produire les cellules d'intérêt à une échelle suffisante en utilisant des protocoles

normalisés et entièrement conformes aux bonnes pratiques de fabrication (GMP pour « good manufacturing process ») (Chen et al., 2014). Pour satisfaire à ces exigences, les cellules hiPS doivent notamment être maintenues en culture sans cellules nourricières dans des milieux de culture exempts de matériel d'origine animale (Chen et al., 2014). Malgré ces mises au point qui restent à faire, la première thérapie cellulaire à base de cellules hiPS vient d'entrer en phase clinique à Kobe (Japon). En effet, un tissu de cellules rétinales dérivées de cellules hiPS a été greffé chez une femme souffrant de dégénérescence maculaire liée à l'âge (Cyranoski, 2013).

3. L'édition du génome ou genome editing

Les lignées de cellules iPS pour modéliser des maladies et en comprendre leur phénotype ont largement été utilisées à ce jour (Robinton and Daley, 2012). Cependant, de nombreuses études ont comparé des lignées de cellules iPS provenant d'un patient atteint d'une maladie et des lignées de cellules iPS provenant d'une personne « saine » ne présentant pas cette pathologie et ont systématiquement conclu que les différences phénotypiques observées entre ces lignées cellulaires résultaient de la maladie (Brennand et al., 2011; Ebert et al., 2009; Lee et al., 2009; Marchetto et al., 2010; Moretti et al., 2010; Sun et al., 2012; Ye et al., 2009). Cependant, ces études sont potentiellement faussées puisqu'elles ne prennent pas en compte certains facteurs qui pourraient être responsables des différences phénotypiques. Tout d'abord, les différences de « fond génétique » sont les plus préoccupantes. Même dans les études dans lesquelles la fratrie est utilisée comme contrôle, seulement environ 50% du génome est partagé entre des enfants de mêmes parents et les différences phénotypiques peuvent être le résultat de variation d'ADN des ~ 50% du génome non partagé par les patients, plutôt que de la mutation associée à la maladie. De plus, un certain nombre d'études a démontré que le processus de génération, d'expansion et de maintien en culture des lignées iPS peut conduire à l'accumulation d'altérations génétiques, allant de la variation d'un seul nucléotide à des anomalies, délétions et réarrangements chromosomiques (Hussein et al., 2011; Ji et al., 2012; Laurent et al., 2011). L'état épigénétique, tel que la méthylation de l'ADN des cellules de départ peut également jouer un rôle dans le phénotype observé. Un certain nombre d'études ont démontré que les cellules iPS semblent conserver la « mémoire » épigénétique de la cellule somatique d'origine à partir de laquelle elles ont été reprogrammées. En effet, certaines lignées iPS semblent conserver cette mémoire

indéfiniment, alors que d'autres la perdent progressivement (Bock et al., 2011; Lister et al., 2011; Polo et al., 2010). L'état épigénétique peut également affecter le potentiel de différenciation d'une lignée de cellules iPS. La différenciation en certains types cellulaires est favorisée par rapport à d'autres. Enfin, des différences d'âge, de sexe et d'origine ethnique des patients, ainsi que des différences de méthode utilisée pour la reprogrammation et les différences de nombre de passages des lignes iPS sont également des facteurs de variations. La comparaison entre lignées cellulaires qui ne diffèrent que par la mutation à l'origine de la maladie, autrement dit entre lignées isogéniques, permet de gommer l'ensemble de ces variations et constitue donc le meilleur contrôle. L'obtention de lignées « isogéniques » a été récemment permise grâce aux nouvelles technologies d'édition du génome (« genome editing »).

3.1 Les techniques d'édition du génome

La technique classique de modification du génome est basée sur la recombinaison homologue au niveau du gène cible (Smithies et al., 1985; Thomas and Capecchi, 1987). Cette approche s'est avérée inestimable pour son utilisation dans les cellules mES et la création des souris invalidées (« knock-out ») ou modifiées (« knock-in ») pour un gène d'intérêt. Cependant, la recombinaison homologue est laborieuse et inefficace dans les cellules hES (Zwaka and Thomson, 2003). La technologie d'édition du génome a récemment grandement progressé grâce à l'apparition de nouvelles techniques d'ingénierie des gènes basées sur l'utilisation de nucléases programmables telles que les méganucléases (Stoddard, 2011), les nucléases à doigts de zinc (ZFNs pour « Zinc Finger Nucleases ») (Urnov et al., 2010), les nucléases effectrices de type activatrice de transcription (TALENs pour « Transcription Activator-Like Effector Nucleases ») (Bogdanove and Voytas, 2011; Scharenberg et al., 2013) et l'endonucléase CAS9 (pour « CRISPR-associated protein 9 ») (Hsu et al., 2014). Les méganucléases sont des enzymes de restriction qui sont caractérisées par un site de reconnaissance de grande taille, entre 12 à 40pb d'ADN. Les ZFNs et TALENs sont des enzymes chimériques consistant en un domaine de liaison à l'ADN fusionné à la séquence correspondant au domaine de clivage de la nucléase FokI (Christian et al., 2010; Kim et al., 1996). La mise au point des ZFNs et méganucléases pour un gène cible nécessite une modification structurelle des protéines par ingénierie des protéines, alors que la construction des TALENs nécessite de nombreux et fastidieux clonages moléculaires (Isalan, 2012; Smith et al., 2006; Sun and Zhao, 2013). Par contre, l'endonucléase CAS9 peut être utilisée telle quelle.

3.2 Cas particulier de la technique CRISPR/CAS9

L'édition du génome en utilisant la CAS9 a été adaptée du système immunitaire adaptatif bactérien connu sous le nom de CRISPR/CAS9 (« Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats » pour groupe de courtes répétitions palindromiques régulièrement espacées). Les CRISPR sont des segments d'ADN procaryotiques contenant en alternance des séquences répétées courtes (Figure 20, en rose) et des fragments d'ADN étranger (Figure 20, « spacer » en mauve) provenant de précédentes expositions à un virus bactérien ou un plasmide. Les bactéries utilisent la CAS9 et les courtes séquences CRISPR transcrites en ARN guides (ARNg) pour reconnaître et couper les séquences d'ADN étranger (ADN plasmidique ou de bactériophage) qui seront ensuite détruites.

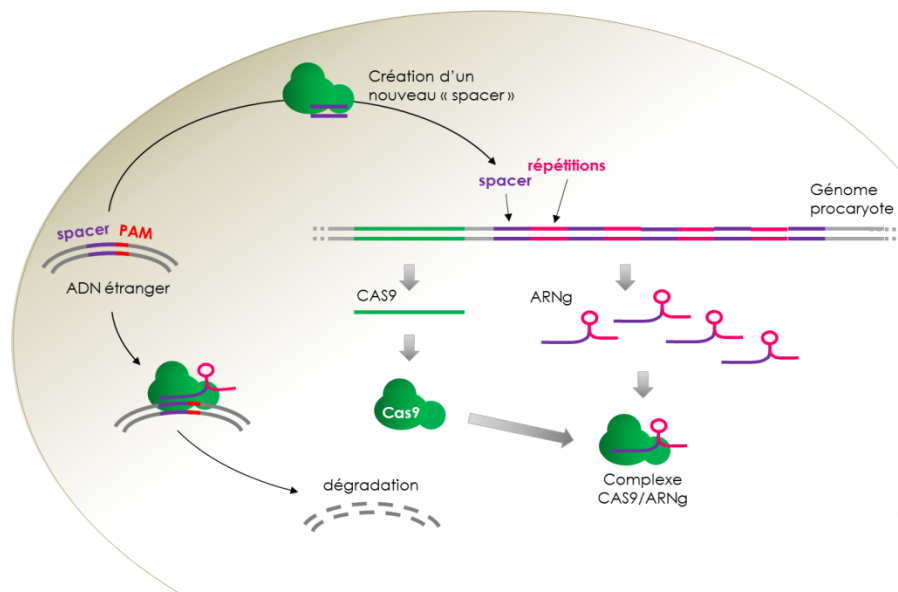


Figure 20: Le système de défense adaptatif CRISPR des bactéries. Suite à l'intrusion d'ADN étranger, certaines endonucléases CAS créent une banque de séquences d'ADN exogènes en les insérant au niveau du locus CRISPR du génome bactérien. Ce locus est composé de gènes CAS encodant pour les CAS endonucléases telles que la CAS9 suivit d'une régions contenant de nombreux morceaux d'ADN étrangers (« spacer » sur le schéma) et de séquences répétées (« répétitions » sur le schéma). Lors d'une nouvelle intrusion, les protéines CAS9 utilisent leur banque de séquences exogènes transcrites en ARN guides (« ARNg » sur le schéma) comme template pour reconnaître et couper spécifiquement l'ADN exogène. L'ADN étranger est ainsi dégradé. Adapté de Hsu et al., 2014.

Début 2013, le système CRISPR provenant de *Streptococcus pyogenes* a été adapté avec succès aux eucaryotes et au génome mammalien (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013b) (Figure 21). Ce système utilise une endonucléase CAS9 qui se complexe avec un ARNg contenant 20 nucléotides (nt) spécifiques au site génomique à cliver (Hsu et al., 2013; Jinek et al., 2012; Jinek et al., 2013). La spécificité du complexe CAS9/ARNg résulte de l'homologie d'appariement entre les bases de l'ARNg et l'ADN génomique, ainsi que la présence d'une séquence génomique PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) correspondant au motif « NGG » (N étant une des 4 bases de l'ADN) reconnu par la CAS9. La CAS9 coupe l'ADN 3 paires de bases en amont du site PAM (Cho et al., 2013; Cong et al., 2013; Jinek et al., 2013; Mali et al., 2013b).

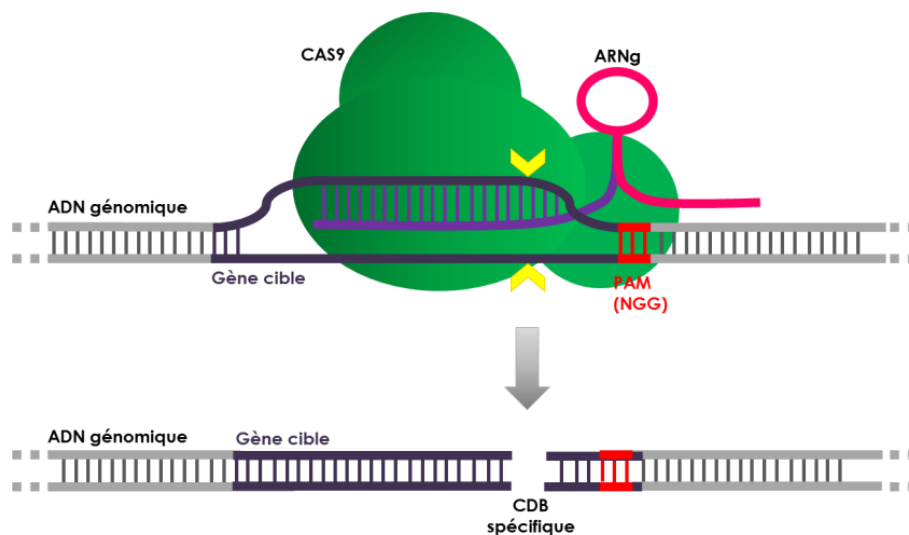


Figure 21: Le système CRISPR/CAS adapté aux cellules eucaryotes. La CAS9 endonucléase possède un signal de localisation nucléaire lui permettant de transloquer dans le noyau. L'ARNg est composé d'une région de 20 nucléotides (en mauve) qui s'apparie par homologie de séquence à l'ADN génomique à couper. L'ARNg est également stabilisé par une région de séquences répétées qui s'apparie en épingle à cheveux et permet l'ancrage dans la CAS9 lors de la formation du complexe CAS9/ARNg. La séquence génomique PAM est constituée de 3 nucléotides (NGG où N est un des 4 nucléotides) et est nécessaire à la liaison de la CAS9 sur l'ADN génomique. La liaison du complexe CAS9/ARNg sur l'ADN génomique conduit à une coupure double-brin par la CAS9, 3 bases en amont de la séquence PAM. Adapté de Mali et al., 2013.

Ainsi, la technologie CRISPR/CAS9 peut facilement être adaptée à n'importe quel gène d'intérêt, en changeant simplement l'ARNg, impliquant la modification d'une séquence de 20 paires de bases, la CAS9 restant inchangée. Le CRISPR/CAS9 permet une édition du génome précise en introduisant des cassures double brin (CDB) dans l'ADN à des loci génomiques spécifiques. La CDB induit l'activation de la machinerie de réparation endogène par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ pour « non homologous end joining ») (Figure 22, rouge) ou par

recombinaison homologue (HDR pour « homology-directed repair ») (Figure 22, vert) lors de laquelle les séquences absentes du brin endommagé sont copiées d'après la chromatide sœur complémentaire (Rouet et al., 1994; Yu et al., 2015)). La machinerie de NHEJ peut réparer la lésion en joignant directement les deux extrémités d'ADN au niveau de la CDB. Bien que cette réparation puisse être précise, elle aboutit le plus souvent à l'apparition de mutations sous forme de petites insertions ou suppressions (INDELS pour INsertions/DELetionS) de séquences. Ces INDELS introduites dans la séquence codante d'un gène peuvent provoquer des changements de cadre de lecture qui conduisent à la dégradation de l'ARNm ou la production de protéines tronquées non fonctionnelles (Hentze and Kulozik, 1999). Ainsi, en utilisant la technologie du CRISPR/CAS9, la machinerie NHEJ peut être utilisée pour inactiver de façon permanente un gène cible en introduisant des mutations de perte de fonction. Alternativement, la CDB induite par CRISPR/CAS9 peut être réparée par la machinerie HDR à l'aide d'une séquence ADN homologue utilisée comme modèle (Lin et al., 2014a; Reinhardt et al., 2013). Le brin homologue est une séquence d'ADN exogène, double ou simple brin, introduit dans la cellule avec les autres composants du système d'édition génétique (CAS9 et ARNg) (Lin et al., 2014b; Rouet et al., 1994). Si l'ADN exogène contient une mutation, cette dernière peut être incorporée de manière stable dans le génome, permettant de réaliser de la mutagenèse dirigée (Ran et al., 2013). La CDB induite par la CAS9 augmente drastiquement les événements de recombinaison homologue au site de cassure (Yu et al., 2015), permettant d'obtenir des rendements très élevés de réparation ou mutagenèse.

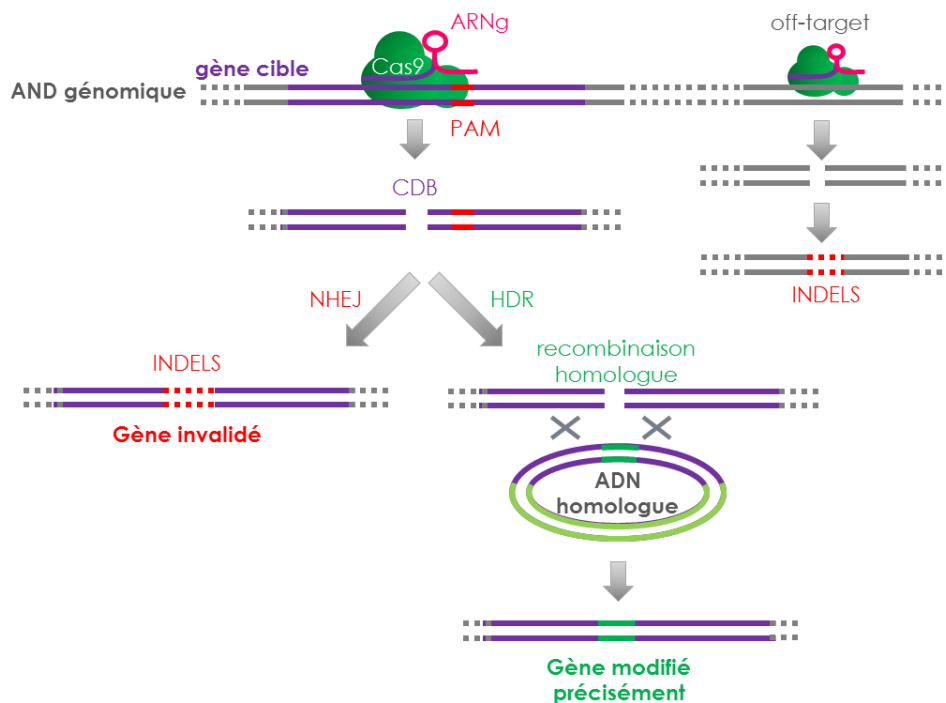


Figure 22: Les machineries de réparation endogènes induites par la CDB. La CDB induit l'activation de la machinerie de réparation endogène par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ pour « non homologue end joining ») ou par recombinaison homologue (HDR pour « homology-directed repair »). La machinerie de NHEJ répare la CDB de manière peu précise et aboutit le plus souvent à l'apparition de mutations sous forme de petites insertions ou suppressions de séquences (INDELS pour INsertions/DEletionS). Ces INDELS provoquent des changements de cadre de lecture conduisant l'invalidation du gène. Alternativement, la CDB peut être réparée de manière plus précise par la machinerie HDR à l'aide d'une séquence ADN homologue utilisée comme modèle. Le brin homologue est une séquence d'ADN exogène, double ou simple brin, introduit dans la cellule avec les autres composants du système d'édition génétique (CAS9 et ARNg). Bien que le CRISPR/CAS permette une correction précise et efficace, la spécificité du complexe ARNg/CAS9 et les coupures non spécifiques potentielles (« off target ») doivent être analysées.

3.3 Spécificité et « off-targets »

En générant des CDB dans l'ADN, réparées par des mécanismes de réparation cellulaire endogènes, l'édition du génome médiée par la CAS9 crée des changements permanents dans le génome des cellules traitées (Figure 22, off target). Bien que cela permette une correction précise et efficace de mutations endogènes, la spécificité du complexe ARNg/CAS9 doit être analysée. En effet, les résultats préliminaires obtenus dans les cellules de mammifères démontrent que le système CRISPR/CAS9 peut tolérer des petites erreurs d'appariement de nucléotides entre l'ARNg et la séquence d'ADN génomique (Cong et al., 2013). En utilisant une combinaison d'ARNg, plusieurs groupes ont analysé la spécificité du complexe ARNg/CAS9 et l'effet de la présence de nucléotides aspécifiques, dans la séquence de l'ARNg, sur la coupure de l'ADN induite par la CAS9 (Fu et al., 2013; Hsu et al., 2013; Mali et al., 2013a; Pattanayak et al., 2013).

Ces études ont ainsi montré que la séquence PAM de *S. pyogenes* est un élément de spécificité important (Hsu et al., 2013). En effet, un appariement aspécifique de l'ARNg loin de la séquence PAM n'engendrera pas de coupure par la CAS9. Dans l'ensemble, l'homologie de séquence entre le site d'ADN génomique cible contenant la séquence PAM et la séquence de l'ARNg semble également être un facteur important, mais aucune règle simple et prédéfinie ne permet de régir la fidélité de la CAS9 (Carroll, 2013). Plus récemment, deux groupes ont effectué le séquençage du génome entier à haute résolution afin d'évaluer le degré de mutagenèse sur l'ensemble du génome après une expérience de CRISPR/CAS9 sur des cellules hiPS (Smith et al., 2014; Veres et al., 2014). Ils montrent que les mutations aspécifiques attribuables à la CAS9 sont très rares et suggèrent que l'incidence de ces effets dans les cellules hiPS est très faible (Smith et al., 2014; Veres et al., 2014).

3.4 CAS9 nickase

Ces 2 dernières années, les efforts d'optimisation de l'endonucléase CAS9 et de l'ARNg ont conduit à des stratégies pouvant grandement améliorer la spécificité de la technologie CRISPR. La conversion de l'endonucléase CAS9 en CAS9 nickase (une enzyme qui clive un seul des deux brins d'ADN) réduit fortement les coupures aspécifiques. Contrairement aux CDB, les coupures simple brin sont réparées très efficacement par la cellule (Okano et al., 2003). Cette stratégie nécessite donc l'utilisation de deux complexes CAS9/ARNg qui génèrent des coupures simple brin sur les 2 brins d'ADN opposés (Ran et al., 2013) (Figure 23). L'utilisation de deux ARNg augmente la spécificité mais diminue l'efficacité de la cassure (Mali et al., 2013a; Ran et al., 2013).

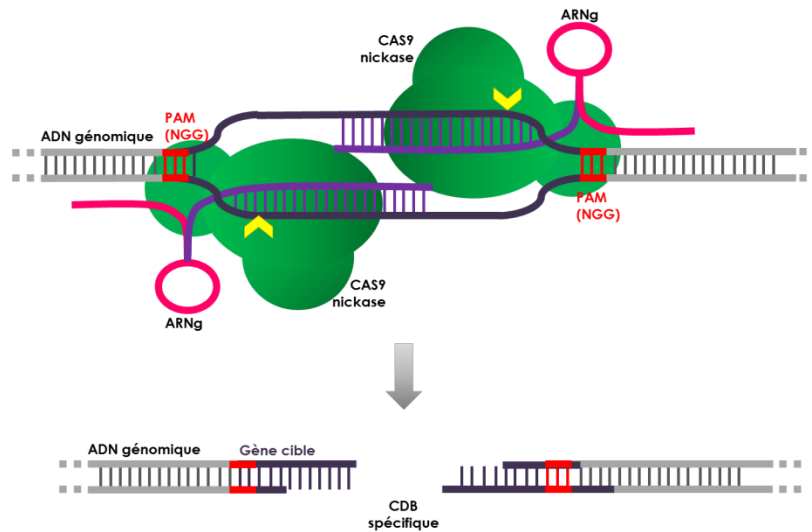


Figure 23: La CAS9 nickase. La CAS9 nickase est une endonucléase CAS9 génétiquement modifiée pour ne couper qu'un seul brin d'ADN. Le principe est équivalent à celui de la CAS9 normale mais il nécessite la présence de deux coupures sur des brins opposés pour permettre une édition du génome. Ce système nécessite donc la construction de 2 ARNs guides différents. En effet, les coupures simples brins sont réparées très efficacement par la cellule. La spécificité du système CRISPR/CAS est ainsi meilleure mais son efficacité est réduite.

3.5 Applications dans la modélisation de pathologies

À ce jour, il y a eu un certain nombre de travaux princeps qui démontrent la faisabilité de l'édition du génome dans les cellules hES et hiPS à l'aide des ZFNs, TALENs et CRISPRs (par exemple Lombardo (Hockemeyer et al., 2009; Hockemeyer et al., 2011; Lombardo et al., 2007; Mali et al., 2013b; Pan et al., 2011; Sebastiano et al., 2011; Soldner et al., 2011; Suzuki et al., 2008; Yusa et al., 2011; Zou et al., 2011)). Il existe par contre très peu d'études dans lesquelles le CRISPR/CAS9 est utilisé pour générer des cellules hiPS isogéniques (sauvage ou mutante) qui sont ensuite différenciées en cellules pathologiques d'intérêt dont les différences phénotypiques donnent un aperçu dans la physiopathologie de la maladie (Tableau 2).

Cellules	Gènes ciblés	Isogénique	HDR vecteur	Phénotype	Références
hiPS	CFTR	correction	plasmide PiggyBAC transposon excisable	ré-expression normales et restauration de la fonction de la protéine	Firth et al., 2015
hES/hiPS	SOX2, PAX6, OTX2 et AGO	invalidation inductible	plasmide avec cassette de sélection excisable et inductible	gènes cibles invalidés	Chen et al., 2015
hiPS	THY1	remplacement du locus humain par celui de souris	plasmide	/	Byrne et al., 2014
hiPS	DMD	correction	plasmide avec cassette de sélection floxée (excisable)	expression de la protéine complète	Li et al., 2015
hiPS	HBB	correction	plasmide avec cassette de sélection floxée (excisable)	expression de la protéine complète	Huang et al., 2015
hES/hiPS	17 gènes	correction	plasmide avec cassette de sélection /reporter	/	Merkle et al., 2015

Tableau 2: Génération de cellules hiPS isogéniques par l'utilisation du CRISPR/CAS.

4. L'oreille interne

L'oreille interne est un organe sensoriel constitué du vestibule, responsable de l'équilibre et de la détection de l'accélération et de la cochlée, responsable de l'audition (Figure 24).

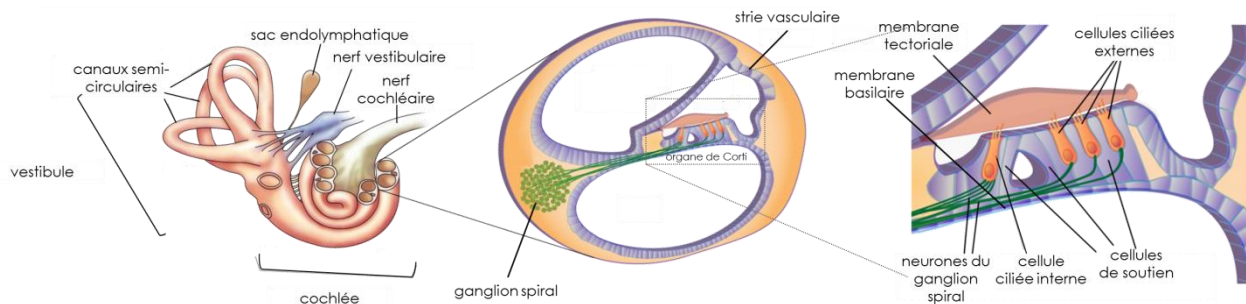


Figure 24: Organisation de l'oreille interne. L'oreille interne est constituée du vestibule et de la cochlée. La cochlée, organe spiralé comprenant l'organe de Corti, véritable organe auditif. Ce dernier est constitué d'un épithélium contenant des cellules ciliées qui convertissent les ondes acoustiques en stimuli électriques et qui reposent sur des cellules de soutien. L'organe de Corti repose sur la membrane basilaire et est recouvert par la membrane tectoriale, une membrane fibreuse et gélatineuse. Les cellules sensorielles, doivent leur nom à la présence apicale d'une touffe « ciliaire » composée de stéréocils, expansions cytoplasmiques riches en actine. Elles sont disposées de façon particulière à savoir en une rangée de cellules ciliées internes qui sont les véritables récepteurs sensoriels et de trois rangées de cellules ciliées externes intervenant dans la précision auditive. Ces cellules ciliées transmettent les informations auditives aux neurones du ganglion spiral auxquels elles sont connectées.

La cochlée est principalement composée d'un épithélium pseudo-stratifié formant l'organe de Corti. L'épithélium est constitué d'une alternance de cellules sensorielles responsables de la transduction du son - les cellules ciliées mécano-sensibles - et de cellules de soutien. Les cellules ciliées possèdent une touffe de stéréocils à leur surface apicale et sont innervées par les neurones

sensoriels du ganglion spiral, premier relais nerveux vers le système nerveux central. Le canal cochléaire contenant l'organe de Corti est rempli de liquide endolymphatique ou endolymphe qui est sécrétée par les cellules de la strie vasculaire et est composée d'une forte concentration de K^+ et une faible concentration de Na^+ , essentielles pour le processus de transduction du son. Lors de la perception d'un son, l'onde sonore engendre des vibrations de la membrane basilaire, sur laquelle repose l'organe de Corti. Ces vibrations créent des forces de tensions entre la surface apicale des stéréocils des cellules ciliées et la membrane tectoriale qui conduisent à l'ouverture de canaux potassiques mécano-sensibles. Suite à l'ouverture de ces canaux, du potassium provenant de l'endolymphe entre dans la cellule ciliée et la dépolarise. Des canaux Ca^{2+} voltage-dépendant s'ouvrent alors et du calcium entre dans le cytoplasme, engendrant la libération de neurotransmetteur (glutamate) permettant la transmission du signal nerveux aux neurones du ganglion spiral.

4.1 Développement précoce

Malgré son organisation complexe, l'origine embryonnaire de l'oreille interne est simple. En effet, mis à part les mélanocytes de la strie vasculaire (l'épithélium sécrétoire de la cochlée) et les cellules gliales du ganglion spiral qui ont pour origine des cellules des crêtes neurales, tous les types cellulaires de l'oreille interne dérivent de la placode otique (Fekete, 1996 ; Steel and Brown, 1994 ; Fritzsh et al, 1997). La placode otique dérive d'une région de l'ectoderme antérieur non-neural, appelée région pré-placodale (PPR) et située à la frontière entre la plaque neurale et l'ectoderme (Chen and Streit, 2013) (Figure 25).

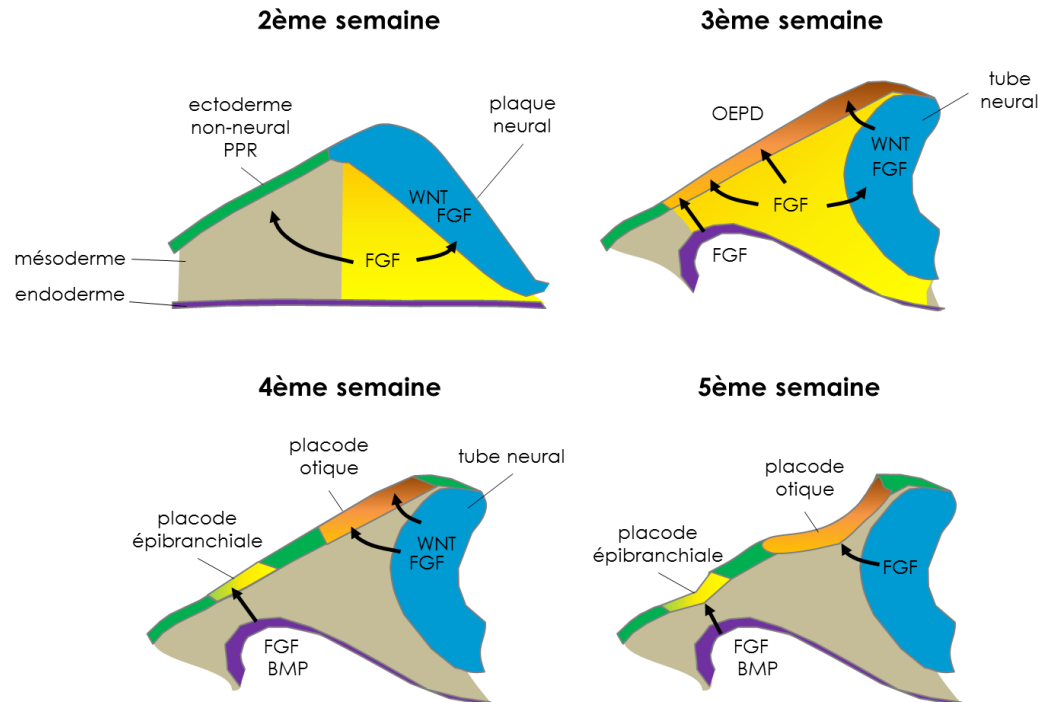


Figure 25: L'induction optique débute aux alentours de la 2^{ème} semaine post fécondation chez l'homme. L'atténuation de la signalisation BMP et WNT et l'induction simultanée de la voie des FGFs sont nécessaires à l'induction de la PPR, une région d'ectoderme non-neural antérieur, adjacent à la plaque neurale. Le domaine des progéniteurs optiques-épibranchiaux (OEPPD) est induit à partir de la région pré-placodale (PPR) et l'activation de la voie des FGFs et de la voie WNT induisent la placode optique vers la 4^{ème} semaine post fécondation. A partir de la 5^{ème} semaine post-fécondation, la placode optique s'invagine et le mésenchyme péri-optique encapsule l'épithélium pour former la vésicule optique ou otocyste

L'induction de la PPR est initiée aux alentours de la 3^{ème} semaine (après fécondation) chez l'homme (correspondant au jour embryonnaire (E) 7.5-8, chez la souris) (Bailey and Streit, 2006; Pieper et al., 2012; Schlosser, 2007; Schlosser, 2014). Les signaux qui induisent la PPR sont produits par la région postérieure de l'ectoderme neural et le mésoderme sous-jacent à la placode. Chez les vertébrés, l'atténuation de la signalisation BMP et WNT et l'induction simultanée de la voie des FGFs sont nécessaires à l'induction de la PPR (Pieper et al., 2012; Reichert et al., 2013). Il a été montré que les voies WNT et BMP inhibent l'expression des gènes de PPR et inversement, l'inhibition de ces signaux augmente l'expression de ces gènes (Freter et al., 2008; Ladher et al., 2000; Litsiou et al., 2005). Les cellules de la PPR sont caractérisées par l'expression des facteurs de transcription des familles SIX et EYA tels que SIX1, SIX4, EYA1 et EYA4 (Groves and Bronner-Fraser, 2000; Groves and LaBonne, 2014; Saint-Jeannet and Moody, 2014; Yajima et al., 2014). La région PPR se différencie en un domaine précurseur optique/épibranchial suivi par l'induction de la placode optique elle-même (Whitfield, 2015). Les placodes adénohypophysaire, olfactive, optique et trigéminal dérivent également de la PPR et se

différencient ensuite en épithélia sensoriels contribuant aux organes des sens tels que l'olfaction, la vision ou forment les parties distales des ganglions crâniens (Streit, 2008).

Durant la 4^{ème} semaine post-fécondation (E8 – 9 chez la souris), la PPR se présente sous la forme d'un épithélium stratifié épais et devient compétente pour répondre aux facteurs inducteurs de la placode otique (Martin and Groves, 2006b) (Figure 25). De nombreuses études suggèrent que l'activation de la voie des FGFs et de la voie WNT induisent la placode otique (Freter et al., 2008; Schimmang, 2007; Vendrell et al., 2000). Différents membres de la famille des FGFs jouent un rôle dans l'induction otique selon les espèces. Les ligands FGFs qui induisent spécifiquement la placode otique chez l'homme sont encore inconnus. Le FGF2 est utilisé *in vitro* pour induire les progéniteurs otiques à partir de cellules hiPS, car il induit de manière globale la signalisation FGF en liant les 4 récepteurs FGFR (Oshima et al., 2010). De même, FGF19 ou une combinaison de FGF3 et FGF10 induisent également les progéniteurs otiques humains en culture (Chen et al., 2012; Ronaghi et al., 2014). D'ailleurs, la mutation du gène *FGF3* conduit, chez l'homme, à une absence totale d'oreille interne confirmant son rôle au cours du développement précoce (Tekin et al., 2007). De manière importante, FGF2 induit l'expression de PAX2 chez de nombreuses espèces (Chen et al., 2012; Martin and Groves, 2006b; Ohyama et al., 2007) et al., 2012). Les facteurs de transcription de la famille PAX sont largement utilisés pour distinguer les différentes placodes: PAX6 est exprimé par les cellules des placodes antérieures (adénohypophysaire, olfactive et optique), PAX3 est exprimé par la placode trigéminal et, PAX2 et PAX8 sont exprimés par les placodes postérieures (otique et épibranchiale) (Baker et al., 1999; Bhattacharyya and Bronner-Fraser, 2008; Ladher et al., 2010; Patthey and Gunhaga, 2011; Schlosser, 2006). Les facteurs de transcription PAX2 et PAX8 sont exprimés dès le début de la formation de la placode otique et sont largement utilisés comme marqueurs des progéniteurs otiques (Christophorou et al., 2010; Freter et al., 2012; Hans et al., 2004; Krelova et al., 2002; Mackereth et al., 2005; Ohyama et al., 2006). La souris invalidée pour PAX2 montre des défauts développementaux cochléaires majeurs (Torres et al., 1996).

A partir de la 5^{ème} semaine post-fécondation (E8.5-9 chez la souris), la placode otique s'invagine et le mésenchyme péri-otique encapsule l'épithélium pour former la vésicule otique ou otocyste (Ohyama et al., 2006). La vésicule otique se développe ensuite pour donner le vestibule et la cochlée qui atteindra ses 2,5 tours de spires définitifs entre les 8^{ème} et 9^{ème} semaines post-fécondation (Moore and Linthicum, 2007). A ce stade, les cellules de l'épithélium sont toujours

indifférenciées et expriment les facteurs de transcription PAX2 et PAX8 (Ohyama et al., 2006). Chez l'homme, un espace au sein de cet épithélium cochléaire a été identifié en tant que « domaine prosensoriel » (Locher et al., 2013). Ce domaine contient les progéniteurs des cellules ciliées internes (CCIs), des cellules ciliées externes (CCEs) et de plusieurs types de cellules de soutien, qui ensemble, forment l'organe de Corti (Fekete et al., 1998; Kiernan et al., 2005; Locher et al., 2013). Au milieu de la 8^{ème} semaine post-fécondation, ces progéniteurs expriment les facteurs de transcription de la famille SOX : SOX2 et SOX9 (Locher et al., 2013).

4.2 Développement du ganglion spiral

Le ganglion spiral (GS) se forme tôt dans le développement de l'oreille interne par délamination de la placode otique (Maier et al., 2014). Dès la fin de la 3^{ème} semaine post-fécondation (E8 chez la souris), certaines cellules épithéliales se détachent de la vésicule otique et migrent pour former le ganglion cochléo-vestibulaire (Appler and Goodrich, 2011). Les neuroblastes expriment, à ce stade, le facteur de transcription NEUROD (Hammond and Whitfield, 2011). Le ganglion cochléo-vestibulaire se divise ensuite pour former, à la fin de la 6^{ème} semaine post-fécondation, les ganglions vestibulaire et cochléaire (Bibas et al., 2006). Ensuite, le réseau d'innervation hautement spécialisée des neurones afférents du ganglion spiral (SGNs pour « spiral ganglion neurons ») de type I et II se développe et coïncide avec le développement du domaine prosensoriel de l'OC. Chez l'homme, plusieurs SGNs de type I innervent une seule CCI et constituent jusqu'à 90 à 95% de la population totale des SGNs. Inversement, un seul SGN de type II contacte plusieurs CCEs (Spoendlin and Schrott, 1988). Au milieu de la 10^{ème} semaine post-fécondation, les SGNs expriment la PERIPHERINE (PRPH) et la TUBULINEbeta3 (TUBB3) (Locher et al., 2013) (Figure 26). De la 12^{ème} à la 15^{ème} semaine post-fécondation, les SGNs projettent leurs neurites doublement positifs pour PRPH et TUBB3, au travers du domaine prosensoriel et innervent successivement les premières CCIs différenciées puis les CCEs (Locher et al., 2013). Enfin, entre la 18^{ème} et la 20^{ème} semaine post-fécondation, les neurones se spécifient en type I innervant les CCIs et exprimant la TUBB3 uniquement, et type II innervant les CCEs et exprimant à la fois la TUBB3 et la PRPH (Locher et al., 2013).

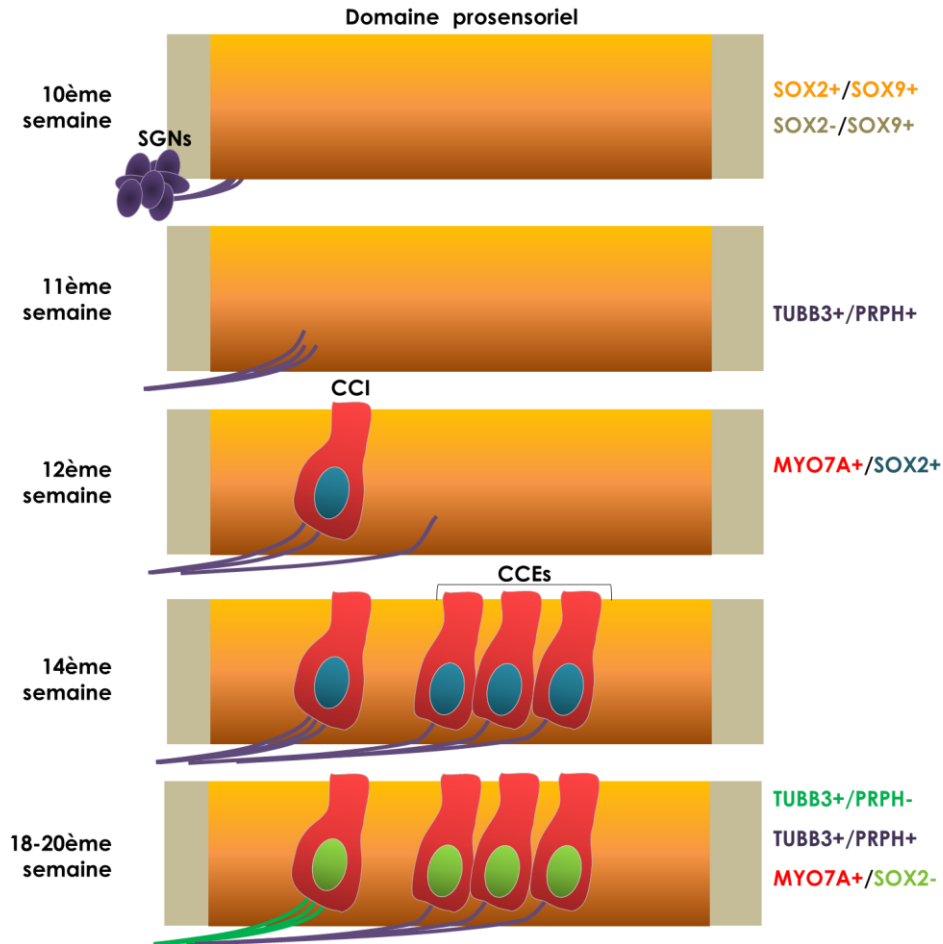


Figure 26: Le développement tardif de l'organe de Corti. Au sein de la vésicule otique, chez l'homme, un espace a été identifié en tant que « domaine prosensoriel » identifié par l'expression de SOX9 et SOX2. Les neurones du ganglion cochléo-vestibulaire (SGNs) formé à la fin de la 6^{ème} semaine post-fécondation, commencent à innover le domaine prosensoriel à partir de la 10^{ème} semaine post-fécondation. A ce stade, les neurites (en mauve) co-expriment TUBB3 et PRPH. De la 12^{ème} à la 14^{ème} semaine, les premières cellules ciliées internes (CCIs) puis externe (CCEs) MYO7A+/SOX2+ apparaissent et sont innervées indifféremment par des neurites TUBB3+/PRPH+. Après à la 18^{ème} semaine, les neurones se spécifient en type I innervant les CCIs et exprimant la TUBB3 uniquement (vert foncé), et type II innervant les CCEs et exprimant à la fois la TUBB3 et la PRPH (mauve). A ce stade les CCs n'expriment plus SOX2.

4.3 Différenciation des cellules de l'organe de Corti

4.3.1 Cellules ciliées

Une cellule progénitrice du domaine prosensoriel se différencie soit en une cellule ciliée, soit en une cellule de soutien (Fekete et al., 1998; Laine et al., 2010; Oesterle et al., 2008). Chez l'homme, les cellules ciliées se forment à partir du domaine prosensoriel entre la 12^{ème} et la 14^{ème} semaine post-fécondation (Neves et al., 2011; Pujol and Lavigne-Rebillard, 1985) (Figure 27). A la suite d'une période de prolifération (10^{ème} et 11^{ème} semaine post-fécondation), les cellules prosensorielles expriment p27kip1, un inhibiteur du cycle cellulaire, selon un gradient apico-

basal, qui conduit à l'arrêt de la prolifération des cellules du domaine pro-sensoriel (Chen and Segil, 1999; Lee et al., 2006). Ensuite, les CCI puis les CCE se différencient progressivement selon un gradient inverse long de la cochlée, de la base vers l'apex (Anniko, 1983). L'expression des marqueurs de progéniteurs otiques tels que PAX2 et PAX8 est réduite (Groves and Fekete, 2012) et le premier signe de différenciation en cellule ciliée est l'expression spécifique des protéines ATONAL HOMOLOG 1 (ATOH1) et MYOSINE7A (MYO7A) (Locher et al., 2013). A ce stade, les cellules ciliées continuent d'exprimer SOX2 alors que l'expression de SOX9 et SOX10 diminue (Locher et al., 2013). La MYO7A est une protéine motrice qui joue plusieurs rôles dans la transduction mécanique du son et dans la morphogénèse des stéréocils des cellules ciliées (Adato et al., 2005; Self et al., 1998) tandis qu'ATOH1 est un facteur de transcription essentiel à la formation des cellules ciliées (Bermingham, 1999). A la 20^{ème} semaine post-fécondation, les CCIs et CCEs n'expriment plus SOX2 contrairement aux autres cellules de l'organe de Corti (Lee et al., 2006; Locher et al., 2013; Pujol et al., 1991). La 20^{ème} semaine post-fécondation correspond au début de la fonctionnalité de cellules cochléaires chez l'homme (Bibas et al., 2008; Pujol and Lavigne-Rebillard, 1995; Pujol et al., 1991).

La voie de signalisation la mieux caractérisée et impliquée dans la régulation du développement des cellules ciliées est la voie de signalisation NOTCH. De manière générale, l'activation de la voie NOTCH est associée au « destin cilié » (Mizutari et al., 2013; Tona et al., 2014) (Figure 27). Les futures cellules ciliées expriment JAG2 et DELTA1 (Lanford, 1999; Morrison et al., 1999) qui se lient au récepteur NOTCH1 des cellules adjacentes, conduisant à son clivage et à la libération d'un fragment intracellulaire NOTCH-ICD (NICD). Les fragments NICD induisent l'expression de facteurs de transcription à domaine bHLH du groupe E de la famille des « Hairy and Enhancer of split » (HES) et plus particulièrement HES1 et HES5 (Hayashi et al., 2008; Lanford et al., 2000; Zine, 2001), qui inhibent l'expression d'*ATOH1*, conduisant à l'inhibition du « destin cilié ». Les cellules inhibées se développent ultérieurement en cellules de soutien (Kiernan et al., 2006; Lanford, 1999; Petrovic et al., 2014).

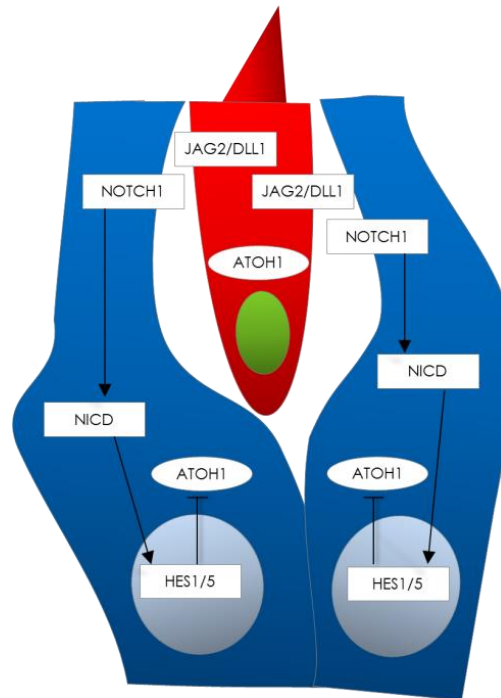


Figure 27: La signalisation NOTCH dans le développement des cellules ciliées (en rouge) et cellules de soutien (en bleu). Les futures cellules ciliées expriment JAG2 et DLL1 qui se lient au récepteur NOTCH1 des cellules adjacentes, conduisant à son clivage et à la libération d'un fragment intracellulaire NICD. Les fragments NICD induisent l'expression de facteurs de transcription HES1 et HES5. Ces derniers inhibent l'expression d'ATOH1, conduisant à l'inhibition du « destin cilié ». Les cellules dans lesquelles ATOH1 est inhibé se développent ultérieurement en cellules de soutien.

Lors du développement des cellules ciliées, la formation des stéréocils débute par l'émergence d'un kinocilium constitué de microtubules, au centre de la surface apicale de la cellule (Figure 28, A). Le kinocilium migre ensuite vers sa destination finale au bord de la cellule ciliée (Figure 28, B) (Denman Johnson and Forge, 1999 ; Ross et al, 2005).

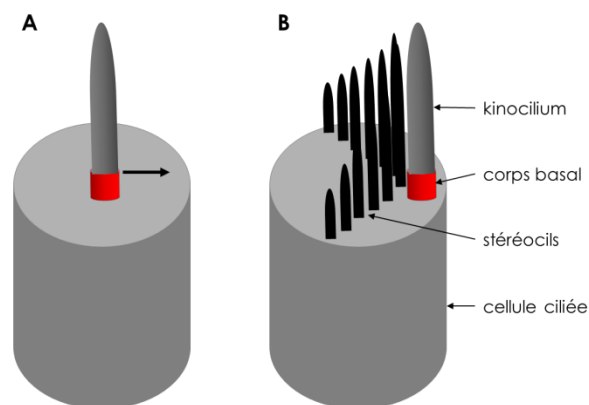


Figure 28: Développement du kinocilium et des stéréocils à la surface apicale des cellules ciliées. A : Lors du développement des cellules ciliées, la formation des stéréocils débute par l'émergence d'un kinocilium, au centre de la surface apicale de la cellule.

B : Le kinocilium migre ensuite vers sa destination finale au bord de la cellule ciliée et permet le développement correcte des stéréocils. Adapté de Axelrod, 2008.

Des stéréocils riches en actine s'organisent ensuite autour du kinocilium pour former un faisceau de stéréocils (Axelrod, 2008). Finalement, après la naissance, le kinocilium disparaît et les stéréocils jouent un rôle central dans la transduction mécano-sensible du son.

4.3.2 Cellules de soutien

L'épithélium sensoriel de l'oreille interne est donc constitué d'une alternance de cellules ciliées et de cellules de soutien. Il existe différents types de cellules de soutien telles que les cellules pilier, les cellules de Hensen et les cellules de Deiters par exemple (Figure 29).

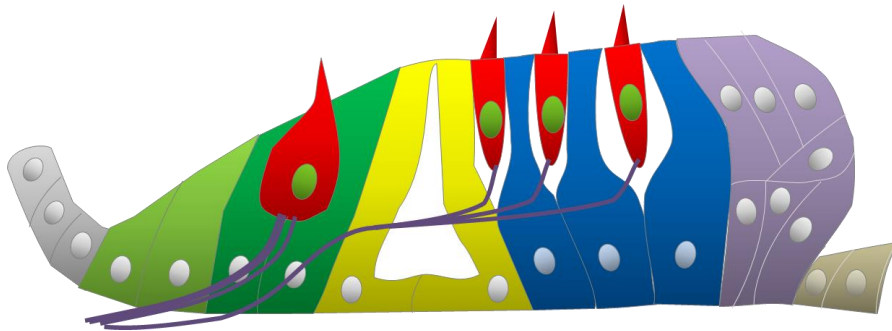


Figure 29: Les différents types de cellules de soutien. Les cellules de soutien reprennent différents types de cellules à savoir les cellules bordantes internes et les cellules phalangées internes (en vert foncé) sur lesquelles repose la CCI (en rouge) ; les cellules piliers interne/externe (en jaune) qui forment la paroi interne/externe du tunnel de Corti; les cellules de Deiters (en bleu) qui supportent les CCEs (en rouge), les cellules de Hensen (en mauve) qui forment la lame réticulaire. De part et d'autre de l'OC, on retrouve les cellules de Claudius (en brun) et les cellules du sulcus interne (en gris).

Ces cellules fournissent un support mécanique aux cellules ciliées mais jouent également différents rôles importants dans le recyclage des ions K^+ , Na^+ et Ca^{2+} et le maintien de l'homéostasie de l'endolymphe (Taylor et al., 2015). Contrairement aux cellules ciliées, les cellules de soutien différenciées continuent d'exprimer SOX2, SOX9 et SOX10 (Mak et al., 2009). Comme décrit plus haut, les cellules ciliées et de soutien se différencient en parallèle à partir des mêmes progéniteurs. L'expression de SOX2 est maintenue dans les cellules de soutien par la voie de signalisation NOTCH et le facteur de transcription à homéodomaine PROX1 (Dabdoub et al., 2008). Il a également été montré que SOX2 réprime ATOH1 et inversement, l'expression d'ATOH1 diminue l'expression de SOX2 (Dabdoub et al., 2008; Kelley, 2006). La

voie des FGFs, en coordination avec la signalisation NOTCH, permet le développement des cellules piliers (Doetzlhofer et al., 2009; Jacques et al., 2007; Szarama et al., 2012). Ces effets semblent être médiés par FGF2 et FGF8 chez la souris (Jacques et al., 2007; Mueller et al., 2002). La voie de signalisation des FGFs semble également jouer un rôle dans le destin de certaines cellules de soutien. En effet, au sein des cellules piliers le FGF17 induit directement l'expression du facteur de transcription à domaine bHLH du groupe E (comme les HES), HEY2 (pour « hairy and Enhancer of Split related with YRPW motif »), un inhibiteur d'ATOH1, qui est normalement régi par la voie NOTCH (Doetzlhofer et al., 2009). Ainsi, HEY2 est activé par les FGFs dans les cellules piliers entraînant l'inhibition d'un destin « cilié » suite à l'expression de HEY2 et ce de manière indépendante de la voie NOTCH.

5. Différenciation des cellules ES ou iPS en cellules de l'oreille interne

5.1 Chez la souris

Plusieurs protocoles de différenciation en cellules de l'oreille interne à partir de cellules mES ont été développés au cours des dernières années (Chen et al., 2012; Koehler et al., 2013; Li et al., 2003; Oshima et al., 2010; Oujii et al., 2012). Tous ces protocoles de différenciation *in vitro* en cellule cochléaire tentent de mimer et reproduire les différentes étapes du développement de l'oreille interne avec plus ou moins de succès (Tableau 3).

Cellules de départ	Type de protocole	Références	Cellules d'intérêt	Induction ectoderme*	Induction otique	Différenciation	Efficacité	Fonctionnalité
mES	Adhérent	Oshima et al, 2010	Cellules ciliées	+SB431542, DKK1 et IGF1 pendant 5j	+ FGF2 pendant 3j	co-culture avec cellules d'utricule de poulet pendant 12j	1-2%**	Oui Mécano-sensibles
		Ouji et al, 2012	Cellules ciliées	+10% FBS pendant 4j	/	différents milieux conditionnés pendant 15j	20%** FM1-43+/BRN3C+	Non
		Ouji et al, 2013	Cellules ciliées	+10% FBS pendant 4j	/	+DOX (ATHOH1) pendant 15j	10%** MYO6+/BRN3C+	Non
	3D	Koehler et al, 2013	Épithélium sensoriel complet	+KSR pendant 2j puis +BMP4, SB431542 pendant 2j	+ FGF2, LDN pendant 3j Puis Sans facteur de croissance pendant 6j	Sans facteur de croissance pendant 15j	1500 cellules ciliées par EB	Oui
		Costa et al, 2015	Cellules ciliées	sans LIF +10%FBS pendant 4j	/	+DOX (ATHOH1, POU4F3 et GF1) + acide rétinolique pendant 8j	44%** MYO7A+/ESPINE+	Non FM1-43+
hES	Adhérent	Shi et al, 2007	Neurones	+N2 pendant 5j	/	+FGF2, NT3, BDNF, BMP4 pendant 5j puis +NT3, BMP4 pendant 10j	15%** TUBB3+/PERIPH+	Non
		Chen et al, 2012	Cellules ciliées et neurones	/	+FGF3, FGF10 pendant 12j puis +IGF, FGF2, EGF en maintenance	Cellules ciliées: +RA, EGF pendant 14 à 28j Neurones: +FGF2, SHH, NT3, BDNF pendant 7 à 14j	45%** ATHOH1+/BRN3C+ et BRN3C+/MYO7A 100%** BRN3A+/TUBB3 et TUBB3+/NF200+	Oui Expériment des canaux K+ Ca2+ Oui Génèrent un potentiel d'action
	Adhérent	Gunewardene et al, 2014	Neurones	+Noggin, FGF2 pendant 14j puis +EGF, FGF2, Y-27632 pendant 10j	/	Sans facteur de croissance pendant 11j	100% des neurosphères BRN3A+/ISLET1+	Oui
		Ronaghi et al, 2014	Cellules ciliées	+SIS3, DKK1, IGF1 pendant 15j	+FGF2, FGF19, HS, Noggin, R-spondin1 pendant 3j puis FGF2, FGF19, HS et BMP4 pendant 3j	sans facteur de croissance +KSR de 15% à 5% pendant 20j	2,5 - 5,2%** ATHOH1/MYO7A	Non
		Ohnishi et al, 2015	Cellules ciliées	sans serum pendant 8j	+FGF2 pendant 15j	sans facteur de croissance +Matrigel pendant 48j	0,01%** MYO6+	Non

Tableau 3: Les protocoles de différenciation de cellules mES, hES et hiPS en cellules cochléaires

Le groupe du Dr. Heller est le premier à démontrer que des cellules ciliées de l'oreille interne fonctionnelles peuvent être dérivées de cellules ES et iPS de souris (Oshima et al., 2010). Les cellules ciliées murines qu'ils dérivent possèdent des stéréocils et un kinocilium ayant une architecture similaire aux cellules ciliées immatures. Elles expriment plusieurs marqueurs de cellules ciliées tels que la MYO7A et ATOH1, et des stéréocils tels que la F-ACTINE et l'ESPINE, et semblent être mécano-sensibles. Le protocole consiste à essayer de reproduire les principales étapes du développement normal : différenciation en ectoderme non-neural, induction de progéniteurs otiques et différenciation en cellules de l'oreille interne. Ils ont d'abord généré de l'ectoderme antérieur non neural en inhibant les voies WNT (par DKK1) et TGFbeta (par SIS3) empêchant ainsi la formation de cellules méso-endodermiques. De plus, ils ont ajouté de l'IGF1 pour favoriser la formation d'ectoderme antérieur (Pera et al., 2001) qui est plus compétent pour

l'induction otique que l'endoderme épidermique (voir 4.1 *développement précoce*) (Groves and Bronner-Fraser, 2000). L'étape suivante consiste à induire le développement des progéniteurs otiques, grâce à l'ajout de FGF2 ou une combinaison de FGF3 et FGF10 au milieu de culture. En plus de l'activation de la signalisation FGFs, l'activation de la voie WNT est également impliquée dans l'amplification de l'induction des progéniteurs otiques (Ohyama et al., 2006). De manière surprenante, aucune augmentation du nombre de progéniteurs otiques n'est observée après induction simultanément de la voie de signalisation WNT (par WNT3a ou LiCl). Pour que ces progéniteurs otiques se développent en cellules ciliées fonctionnelles, ils sont ensuite transférés sur une monocouche nutritive (« *feeder layer* ») de cellules d'utricule de poulet dont la prolifération a été stoppée artificiellement et cultivés en l'absence de FGF2 (Oshima et al., 2010). Le simple retrait des facteurs de croissance du milieu de culture est un moyen efficace pour induire la différenciation des progéniteurs otiques (Li et al., 2003) tandis que les cellules nourricières fournissent un environnement, un contact cellulaire et un ou plusieurs signaux nécessaires à la différenciation terminale des cellules ciliées. Cette approche conduit à l'apparition de marqueurs de cellules ciliées, mais celles-ci n'adoptent pas leur morphologie typique avec un large cytoplasme, un gros noyau et un faisceau de stéréocils orienté sur la surface apical). L'efficacité de production des cellules ciliées est faible et représente seulement ~1-2% de la population totale des cellules.

Plus récemment, la culture de cellules ES sous forme d'agrégats de cellules en condition non adhérente ou culture en trois dimensions (culture 3D ou organoïde) a récemment émergé comme une méthode efficace pour générer des organes complexes *in vitro*. Elle fournit un environnement contrôlable et facilite l'étude des mécanismes développementaux sans co-culture avec des cellules nourricières (Koehler et al., 2013; Oujii et al., 2013; Oujii et al., 2012). L'avantage majeur de la culture 3D par rapport à la culture en condition adhérente en monocouche (2D) est que les cellules différenciées sont libres de s'organiser elles-mêmes dans l'épithélium. Dans une culture 2D, les cellules adhèrent à une plaque de culture et sont limitées par ce manque de relief. L'environnement 3D permet aux cellules de se développer plus naturellement, comme elles le font dans l'embryon et ne nécessite pas de tissu exogène ou de facteur de croissance inconnu. Cette approche en 3D a été utilisée de manière très convaincante par l'équipe du Dr. Hashino pour générer de l'épithélium sensoriel de l'oreille interne à partir de cellules mES (Koehler and Hashino, 2014; Koehler et al., 2013). Les étapes du développement précoce menant à la

formation des progéniteurs otiques sont reproduites *in vitro* plus rigoureusement. La voie BMP est d'abord induite avec BMP4 pour générer de l'ectoderme non neural, en présence de SB431542, puis inhibée avec LDN et, en présence de FGF2, pour induire de l'ectoderme preplacodal. Les organoïdes, auto-organisés, contiennent successivement de l'ectoderme non neural, préplacodale puis des placodes otiques. De ces placodes, s'invaginent des vésicules otiques contenant un domaine prosensoriel qui se différencie en cellules ciliées. Ces cellules ciliées développent des stéréocils, possèdent un kinocilium et des propriétés de cellules ciliées immatures (Koehler and Hashino, 2014).

Les travaux précédents décrivent des protocoles relativement complexes mimant le développement embryonnaire par l'ajout de facteur de croissance à la culture pour différencier les cellules mES en cellules ciliées (Koehler et al., 2013; Oshima et al., 2010). Plusieurs groupes ont développé des protocoles de différenciation à partir de mES dans lesquelles certains gènes d'intérêt peuvent être induits de manière artificielle (par la doxycycline). Contrairement aux précédents, ces protocoles ne miment pas les différentes étapes du développement embryonnaire. Une équipe japonaise a publié deux articles utilisant cette méthode pour produire des cellules ciliées exprimant MYOSIN7a, à partir de cellules mES, dans lesquelles ATOH1 est inductible (Ouji et al., 2013). Les mES sont cultivées en conditions non-adhérentes sous forme de corps embryoïdes (EBs) dans laquelle le milieu de culture utilisé est conditionné à partir de cultures de cellules stromales (Ouji et al., 2012). Après 14 jours de culture, jusqu'à 20% des EBs expriment des marqueurs des cellules ciliées comme ATOH1, MYOSINE6, MYOSINE7a et BRN3c. Ils ont également observé des protrusions cellulaires positives pour la F-actine qui rappellent des faisceaux de stéréocils (Ouji et al., 2013; Ouji et al., 2012). Cependant, ces observations sont à prendre avec précaution car aucun stéréocil ou kinocil n'est visible. Par conséquent, il est difficile de savoir si les cellules ciliées différenciées peuvent adopter la morphologie correcte dans les conditions décrites (Ouji et al., 2013; Ouji et al., 2012).

Très récemment, une autre équipe a développé un protocole similaire pour générer des cellules ciliées *in vitro* à partir de mES par surexpression simultanée des facteurs de transcription GF11, POU4F3 et ATOH1 (Costa et al., 2015). L'expression de ces trois facteurs dans des mES induit leur conversion directe en cellules ciliées, après 8 jours en EB, sans ajout de morphogène au milieu de culture.

Cellules de départ	Type de protocole	Cellules d'intérêt	Induction ectoderme*	Induction otique	Différenciation	Efficacité	Fonctionnalité	Références
mES	Adhérent	Cellules ciliées	+SB431542, DKK1 et IGF1 pendant 5j	+ FGF2 pendant 3j	co-culture avec cellules d'utricule de poulet pendant 12j	1-2%**	Oui Mécano-sensibles	Oshima et al, 2010
		Cellules ciliées	+10% FBS pendant 4j	/	différents milieux conditionnés pendant 15j	20%** FM1-43+/BRN3C+	Non	Ouji et al, 2012
		Cellules ciliées	+10% FBS pendant 4j	/	+DOX (ATHOH1) pendant 15j	10%** MYO6+/BRN3C+	Non	Ouji et al, 2013
	3D	Épithélium sensoriel complet	+KSR pendant 2j puis +BMP4, SB431542 pendant 2j	+ FGF2, LDN pendant 3j Puis Sans facteur de croissance pendant 6j	Sans facteur de croissance pendant 15j	1500 cellules ciliées par EB	Oui	Koehler et al, 2013
		Cellules ciliées	sans LIF +10%FBS pendant 4j	/	+DOX (ATHOH1, POU4F3 et GF11) +RA pendant 8j	44%** MYO7A+/ESPINE+	Non FM1-43+	Costa et al, 2015
hES	Adhérent	Neurones	+N2 pendant 5j	/	+FGF2, NT3, BDNF, BMP4 pendant 5j puis +NT3, BMP4 pendant 10j	15%** TUBB3+/PERIPH+	Non	Shi et al, 2007
		Cellules ciliées et neurones	/	+FGF3, FGF10 pendant 12j puis +IGF, FGF2, EGF en maintenance	<u>Cellules ciliées:</u> +RA, EGF pendant 14 à 28j <u>Neurones:</u> +FGF2, SHH, NT3, BDNF pendant 7 à 14j	45%** ATHOH1+/BRN3C+ et BRN3C+/MYO7A 100%** BRN3A+/TUBB3 et TUBB3+/NF200+	Oui Expriment des canaux K+ Ca2+ Oui Génèrent un potentiel d'action	Chen et al, 2012
	Adhérent	Neurones	+Noggin, FGF2 pendant 14j puis +EGF, FGF2, Y-27632 pendant 10j	/	Sans facteur de croissance pendant 11j	100% des neurosphères BRN3A+/ISLET1+	Oui	Gunewardene et al, 2014
		Cellules ciliées	+SIS3, DKK1, IGF1 pendant 15j	+FGF2, FGF19, HS, Noggin, R-spondin1 pendant 3j puis FGF2, FGF19, HS et BMP4 pendant 3j	sans facteur de croissance +KSR de 15% à 5% pendant 20j	2,5 - 5,2%** ATHOH1/MYO7A	Non	Ronaghi et al, 2014
		Cellules ciliées	sans serum pendant 8j	+FGF2 pendant 15j	sans facteur de croissance +Matrigel pendant 48j	0,01%** MYO6+	Non	Ohnishi et al, 2015

5.2 Chez l'homme

La première équipe à avoir adapté le protocole de différenciation en cellule cochléaire à partir de cellules hES est l'équipe de Rivolta (Chen et al., 2012). Ils ont traité les cellules hES directement avec FGF3 et FGF10 et réussi à obtenir simultanément deux types de progéniteurs otiques (sensoriels et neuronaux) en culture. Après une sélection mécanique sur base de leur morphologie cellulaire, ils ont traité les progéniteurs otiques sensoriels avec RA et de l'EGF pour obtenir des cellules ciliées. Cependant, après différenciation, les cellules otiques sensorielles n'affichent qu'une ressemblance rudimentaire avec les cellules ciliées. Plus récemment, l'équipe du Dr.

Heller, pionnière dans la différenciation otique des mES, est également parvenue à différencier des cellules hES en cellules ciliées. La stratégie de différenciation utilisée est similaire à celle développée par Oshima (Oshima et al., 2010). La première étape est l'inhibition des cellules méso-endodermiques (par DKK1 et SIS3, un inhibiteur de la voie TGFbeta) conduisant à la formation d'ectoderme non neural (en présence d'IGF1) compétent pour l'induction otique via l'activation des voies FGFs (par FGF2 et FGF19). Contrairement au protocole d'Oshima *et al.*, durant l'induction otique, la voie WNT est activée par R-spondin tandis que la voie des BMPs est tout d'abord inhibée (par Noggin) puis activée (par BMP4). La différenciation terminale des progéniteurs otiques en cellules ciliées est réalisée sans facteur de croissance et sans cellules nourricières. Les cellules ciliées générées expriment plusieurs marqueurs tels qu'ATOH1, ESPINE, MYO6 et MYO7a. Cependant, les cellules ciliées générées possèdent des protubérances désorganisées caractéristiques de faisceaux de stéréocils immatures (Ronaghi et al., 2014). Les neurones sensoriels auditifs qui innervent les cellules ciliées peuvent également être obtenus *in vitro* à partir de cellules hES et hiPS (Chen et al., 2012; Gunewardene et al., 2014; Shi et al., 2007). Le Dr. Edge et son équipe sont les premiers à réussir à différencier des hES successivement en progéniteurs neuronaux exprimant les marqueurs NESTINE et PAX2 puis neurones sensoriels auditifs exprimant la TUBB3 et la PRPH après un traitement avec FGF2, NT3, BDNF et BMP4 (Shi et al., 2007). Après transplantation des progéniteurs neuronaux au niveau du ganglion spiral de souris, ces derniers connectent l'épithélium sensoriel et expriment des marqueurs synaptiques, suggérant la formation de synapses.

Comme décrit plus haut, l'équipe du Dr. Rivolta (Chen et al., 2012) induit également des progéniteurs neuronaux (simultanément aux progéniteurs sensoriels), et les différencie en neurones sensoriels avec FGF2, SHH, NTF3 et BDNF. Ces neurones sensoriels possèdent une morphologie bipolaire et sont capables de générer des potentiels d'action caractéristiques de neurones du ganglion spiral en culture *in vitro* (Martinez-Monedero et al., 2008). De plus, lorsque les progéniteurs neuronaux sont transplantés au niveau de l'oreille interne d'un mammifère préalablement rendu sourd, ces progéniteurs se différencient et améliorent l'audition de l'animal (Chen et al., 2012). Plus récemment, le Dr. Nayagam et son équipe traitent les cellules avec Noggin et FGF2 pendant deux semaines pour induire les progéniteurs neuronaux. Ensuite, ils détachent ces progéniteurs et génèrent des neurosphères en présence de FGF2 et d'EGF. Ils induisent ensuite des cellules des crêtes neurales après adhésion des neurosphères toujours en

présence de FGF2 et d'EGF. La différenciation terminale en neurone sensoriel est réalisée sans facteur de croissance (Gunewardene et al., 2014).

5.3 Limitations

Le bon développement des organes nécessite une organisation synchronisée et une différenciation coordonnée des populations cellulaires. À ce jour, les mécanismes de signalisation moléculaires et cellulaires qui régissent la différenciation et le développement des cellules cochléaires humaines sont encore trop peu connus. En conclusion, bien que la formation de cellules ciliées à partir de cellules mES et hES soit possible *in vitro*, l'efficacité des protocoles de différenciation reste limitée. En vue d'une utilisation thérapeutique future des cellules différenciées, une optimisation des protocoles est nécessaire. La production d'une population de progéniteurs otiques plus homogènes, des méthodes d'enrichissement et des tests de fonctionnalité doivent être mis au point. La différenciation correcte des cellules ciliées à partir des progéniteurs otiques ne se fait généralement pas complètement dans les cultures adhérentes sauf si certains signaux sont fournis par l'utilisation de cellules nourricières, souvent prélevées de l'oreille interne en voie de développement (Oshima et al, 2010; Chen et al, 2012 ; Sinkkonen et al, 2011 ; White et al, 2006).

6. Les surdités

6.1 Etiologie

Selon L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), plus de 5% de la population mondiale, soit 360 millions de personnes, souffrent de déficience auditive ou surdité (<http://www.who.int/>, 2015). Les déficiences auditives peuvent être classées en deux catégories : les surdités de transmission (liées à une atteinte de l'oreille externe ou moyenne) et les surdités neurosensorielles (dues au dysfonctionnement de l'oreille interne). Une surdité peut être d'origine génétique ou acquise au cours de la vie. Les principales causes de déficience auditive acquise sont les maladies infectieuses (telles que la méningite, la rougeole ou les oreillons), l'utilisation de certains médicaments dont certains antibiotiques et anticancéreux ototoxiques, les traumatismes sonores ou le vieillissement. Les déficiences auditives génétiques peuvent conduire à une surdité pré-linguale, dès la naissance, ou acquise peu de temps après. La moitié des surdités neurosensorielles sont d'origine génétique (Schrijver, 2004). Elles peuvent être syndromiques

(30%) ou non-syndromiques (70%) selon qu'elles soient associées ou pas à d'autres pathologies ou symptômes (Van Laer et al., 2003). Parmi les surdités syndromiques, on peut citer le syndrome de Usher pour lequel les patients souffrent également de rétinite pigmentaire (Bonnet and El-Amraoui, 2012), le syndrome d'Alport caractérisé par des anomalies rénales (Kruegel et al., 2013) ou encore le syndrome d'Alström dont le tableau clinique est très varié et inclut des anomalies cardiaques, métaboliques ou encore rétiniennes (voir paragraphe suivant) (Joy et al., 2007). Parmi les surdités neuro-sensorielles non syndromiques, 80% sont autosomales récessives (DFNB), 15 à 20% sont autosomales dominantes (DFNA) et moins de 2% sont liées au chromosome X (DFN) ou aux mitochondries (Gurtler et al., 2003; Schrijver, 2004).

6.2 Le Syndrome d'Alström

Le Syndrome d'Alström [ALMS, OMIM 203800] est une maladie monogénique rare caractérisée par un ensemble de symptômes incluant une surdité neuro-sensorielle, une rétinite pigmentaire, une obésité juvénile et une résistance à l'insuline conduisant à un diabète de type 2 (Alstrom et al., 1959; Marshall et al., 1997; Michaud et al., 1996). Une cardiomyopathie dilatée peut également se développer subitement - dès la naissance – suite à un problème de différenciation des cardiomyocytes (Louw et al., 2014; Shenje et al., 2014). D'autres atteintes telles que des dysfonctionnements hépatiques et urinaires, de l'épilepsie ou des troubles de la motricité, probablement dus à une réorganisation complexe du cortex et une perturbation des gaines de myéline, sont aussi couramment observées (Citton et al., 2013; Manara et al., 2015; Marshall et al., 2005). Le diagnostic de syndrome d'Alström est difficile, car les enfants touchés présentent le plus souvent, une petite partie de ces symptômes au début de la maladie (Marshall et al., 2007; Marshall et al., 2005). De plus, il existe une variabilité clinique interfamiliale et intrafamiliale dans les phénotypes, tels que l'âge d'apparition et la gravité des symptômes.

6.2.1 Génétique du syndrome d'Alström

Le syndrome d'Alström est causé par des mutations du gène *ALMS1* localisé chez l'homme sur le chromosome 2p13. *ALMS1* couvre 23 exons et code pour une protéine de 461 KDa dont le rôle biologique n'est pas encore élucidé (Collin et al., 2002; Hearn et al., 2002). A l'heure actuelle,

plus de 200 mutations ont été identifiées dont la majorité se localisent au niveau des exons 8, 10 et 16 (« hotspot » en rouge, Figure 30). Ces mutations sont principalement 1/ des mutations « non-sens » qui engendrent l'apparition d'un codon stop et 2/ des insertions/délétions d'un (ou plusieurs) nucléotides qui engendrent un décalage du cadre de lecture (Marshall et al., 2015) (Figure 30).

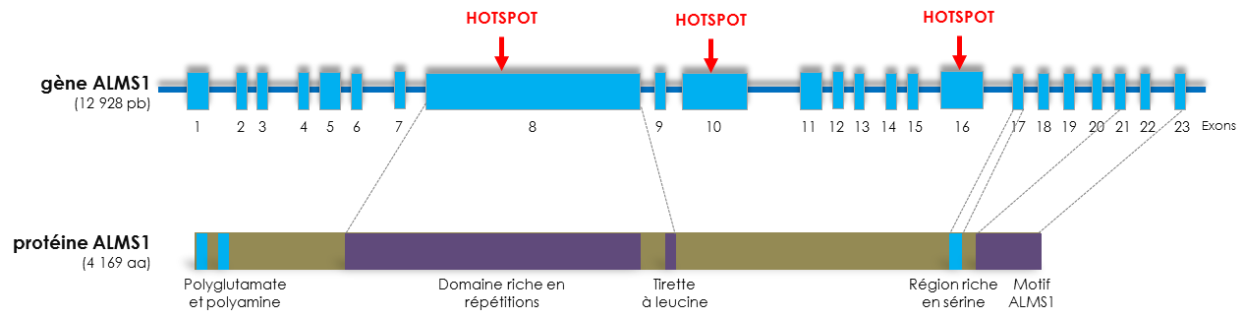


Figure 30: Le gène et la protéine ALMS1 et ses différents domaines. Adapté de Marshall et al., 2015.

Le gène *ALMS1* ne contient aucune homologie de séquence avec d'autres gènes. Il possède une caractéristique structurale remarquable : un exon 8 de 5Kpb composé de 34 répétitions imparfaites d'un motif de 45-50 acides aminés, qui n'a aucune ressemblance à d'autres motifs connus et dont la signification fonctionnelle n'est actuellement pas connue (Collin et al., 2002; Hearn et al., 2002). Chez l'homme, la protéine ALMS1 est localisée au niveau du centrosome (centre organisateur principal des microtubules) et du corps basal des cellules présentant un cil primaire (Figure 31 en rouge) (Bettencourt-Dias and Carvalho-Santos, 2008). Le centrosome joue un rôle important en recrutant de nombreux régulateurs du cycle cellulaire (Azimzadeh and Bornens, 2007; Doxsey et al., 2005) notamment lors de la transition G2-M en favorisant le recrutement et l'activation de nombreuses protéines régulatrices telles que la cycline B, CDK1 et APC/C (Wang et al., 2009) (Figure 31).

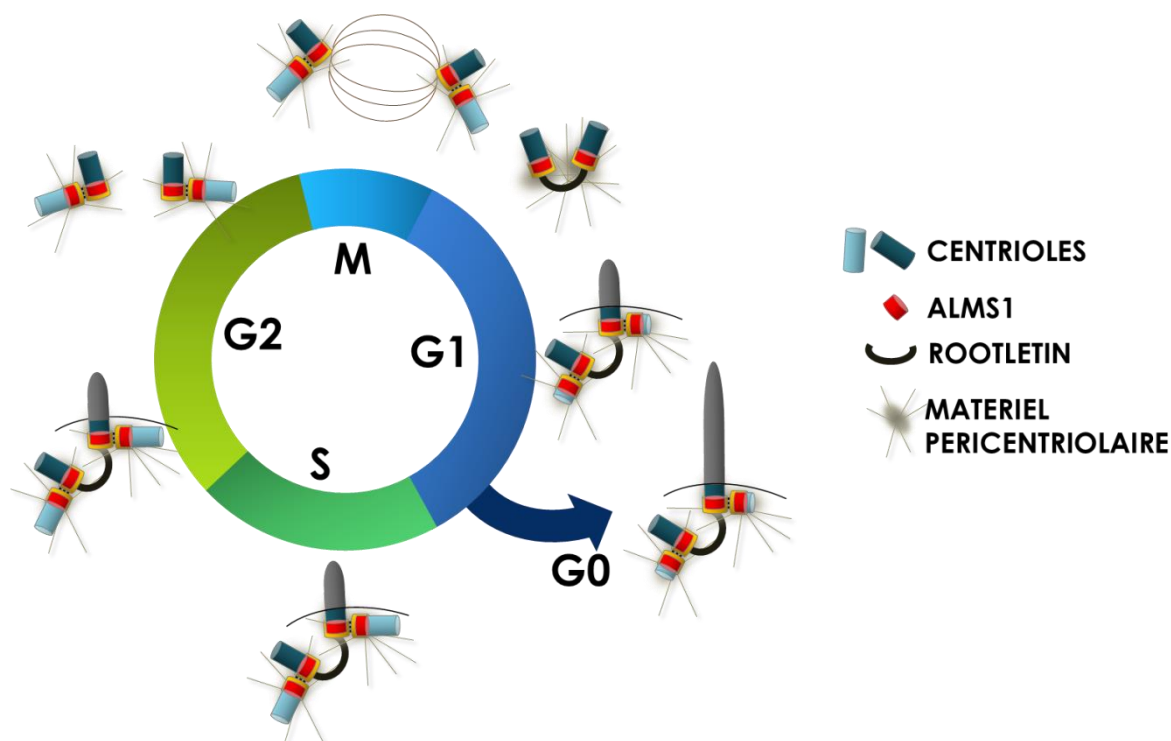


Figure 31 : Le centrosome et le cycle cellulaire. Au cours du cycle cellulaire, à partir de la phase G1, il se duplique de telle sorte que la cellule possède 2 paires de centrioles à l'entrée de G2 (Zou et al., 2005). Pendant toute l'interphase, les deux centrosomes sont liés entre eux par des fibres, constituées de la protéine ROOTLETIN, émanant de leur extrémité proximale basale (où ALMS1 est exprimée) (Lim et al., 2009). Lors de la transition G2-M, les centrosomes se détachent pour permettre la formation du fuseau mitotique et le début de la mitose (Bahe et al., 2005; Fry et al., 1998; Mayor et al., 2002). A la fin de la mitose, chaque cellule possède ainsi son centrosome.

6.2.2 Mécanismes moléculaires impliqués

Il n'existe, à l'heure actuelle, aucun modèle humain du syndrome d'Alström. La majorité des études actuelles sont réalisées post-mortem ou à partir de lignées cellulaires, de culture primaires et des trois modèles murins invalidés pour ALMS1 disponibles (Arsov et al., 2006; Collin et al., 2005; Li et al., 2007a). Les fonctions biologiques d'ALMS1 restent méconnues mais sa localisation cellulaire permet d'émettre l'hypothèse qu'elle pourrait avoir un rôle dans de nombreux phénomènes physiologiques incluant la ciliogenèse, le transport intracellulaire, le contrôle du cycle cellulaire et la différenciation (Cardenas-Rodriguez and Badano, 2009; Collin et al., 2012; Hearn et al., 2005; Knorz et al., 2010; Li et al., 2007a).

6.2.3 Rôles d'ALMS1 dans la ciliogenèse

Le cil primaire est impliqué dans de nombreux processus cellulaires tels que le contrôle du cycle cellulaire et la différenciation, via la coordination de voies de signalisation (Cardenas-Rodriguez and Badano, 2009; Christensen et al., 2012; Christensen et al., 2008; Satir et al., 2010). Pendant le développement d'une cellule ciliée normale de l'oreille interne *in vivo*, comme décrit plus haut, les stéréocils - enrichis en actine - s'organisent en éventail autour du cil primaire, i.e. le kinocilium (Axelrod, 2008). ALMS1 est exprimée au niveau du corps basal de tous les cils primaires des cellules cochléaires, au cours du développement et chez la souris adulte (Jagger et al., 2011). L'invalidation d'ALMS1 chez la souris conduit à des défauts de positionnement du kinocilium des cellules ciliées et à des anomalies architecturales dans la forme et l'orientation des faisceaux stéréociliaires (Jagger et al., 2011). De plus, ALMS1 est également nécessaire pour la formation des cils des cellules rénales (Li et al., 2007a). La diminution de son expression dans des cellules embryonnaires rénales (HEKs) par siARN est associée à une diminution de la longueur des cils. Cependant, de manière surprenante, les souris présentant une forme tronquée de la protéine ALMS1 ont des cils primaires rénaux qui se développent normalement (Li et al., 2007a). Il a également été montré récemment que la protéine ALMS1 régule la voie Notch via la voie de recyclage endosomale (Leitch et al., 2014). La perte d'ALMS1 conduit à l'accumulation du récepteur NOTCH dans les endosomes et une hyperactivation de cette voie. Le dérèglement de cette voie de signalisation peut également expliquer la surdité observée chez les patients ALMS, étant donné que NOTCH est connue pour être impliquée dans la différenciation des cellules cochléaires (voir 4.3 *Différenciation de l'organe de Corti*).

6.2.4 Rôle d'ALMS1 dans le contrôle du cycle cellulaire

Le Dr. Vettor et son équipe ont étudié le rôle biologique d'ALMS1 dans le contrôle du cycle cellulaire. Ils ont montré que les fibroblastes humains mutés pour ALMS1 prolifèrent plus lentement que des fibroblastes sains et sont résistants aux stimuli de mort cellulaire par apoptose (Zulato et al., 2011). Différentes mutations du gène ALMS1 chez plusieurs patients sont associées à une augmentation de la longueur du cycle cellulaire et une diminution de l'expression des gènes directement impliqués dans la progression du cycle cellulaire (par exemple, les cyclines A2, E2 et B1) et la réplication (plusieurs topoisomérases et primases par exemple). De plus, ils ont montré que la protéine ALMS1 contribue à la production de protéines de la matrice

extracellulaire telles que les cadhérines (Zulato et al., 2011). Les fibroblastes mutés sécrètent des niveaux élevés de matrice extracellulaire, responsables de la destruction progressive de l'architecture tissulaire normale et entraînant une fibrose (Zulato et al., 2011).

De manière intéressante, la N-cadhérine (ou CDH2) et l'E-cadhérine (ou CDH1) sont deux protéines exprimées par les progéniteurs otiques (Christophorou et al., 2010; Koehler et al., 2013). Ensuite, au cours du développement de l'oreille interne chez l'homme, la N-cadhérine reste exprimée au niveau des jonctions cellule ciliée-cellule de soutien et entre cellules de soutien tandis que l'E-cadhérine est plus spécifiquement exprimée entre les cellules de soutien uniquement (Collado et al., 2011). De plus, la N-cadhérine et l'E-cadhérine jouent un rôle dans la prolifération (Eguren et al., 2013; Miyamoto et al., 2015; Mui et al., 2015; Stockinger et al., 2001; Zhou et al., 2003). Les effets des cadhérines sur la prolifération sont complexes et encore mal connus. La surexpression de la N-cadhérine induit une diminution de prolifération *in vitro* (Hay et al., 2009) tandis que l'E-cadhérine active le complexe de promotion de l'anaphase (APC pour « Anaphase-Promoting Complex »), un système d'ubiquitination qui commande la destruction des régulateurs du cycle cellulaire (Zhou et al., 2003). La perte de l'expression de l'E-cadhérine est associée aux cellules cancéreuses, et sa surexpression dans des lignées cellulaires cancéreuses engendre une diminution de prolifération (Gottardi et al., 2001; Navarro et al., 1991; St Croix et al., 1998).

6.2.5 Rôle d'ALMS1 dans la différenciation cellulaire

La différenciation correcte d'une cellule est ainsi associée à une sortie de cycle cellulaire (Mahmoud et al., 2013; Pasumarthi and Field, 2002). Les souris invalidées pour ALMS1 développent une déficience auditive associée à une perte prématurée de CCEs (Jagger et al., 2011). De plus, quand ces souris atteignent l'âge de 6 mois, elles présentent des anomalies morphologiques rénales majeures avec une dilatation anormale des tubules rénaux. A l'échelle cellulaire, il apparaît une hyperprolifération, une apoptose massive et une diminution drastique du nombre de cellules présentant un cil primaire (Li et al., 2007a). Une protéine ALMS1 normale est donc nécessaire pour maintenir les cellules rénales en quiescence. Il en est de même pour les cardiomyocytes, puisqu'il a été montré que ceux-ci prolifèrent anormalement chez des patients atteints du syndrome d'Alström (Shenje et al., 2014). De plus, l'invalidation transitoire de

l'ARNm du gène *ALMS1* dans des cardiomyocytes murins en culture induit l'apparition de plusieurs marqueurs de prolifération tels que Ki67 et la phospho-histone H3 (pHH3), une augmentation du pourcentage de cellules cardiaques en phase G2/M et *in fine* un nombre de cardiomyocytes total en culture anormalement élevé (Shenje et al., 2014). Ainsi, dans différents organes, les cellules différenciées semblent réentrer dans le cycle cellulaire et continuent de proliférer anormalement.

BUT DU TRAVAIL

But du travail

Environ 71 millions d'euro péens souffrent de surdit é modérée ou profonde, dont la moitié des cas sont génétiques (<http://www.hear-it.org>). La majorité d'entre elles sont dues à un défaut de la portion auditive de l'oreille interne, *i.e.* la cochlée composée principalement de l'organe de Corti, lui-même structuré en cellules ciliées et cellules de soutien et du ganglion spiral, premier relais nerveux de la transmission du son. Ainsi, chez l'homme, la perte des cellules cochléaires est irréversible et conduit à une surdit é dite « neurosensorielle ».

Le syndrome d'Alström est une maladie génétique, autosomale récessive, caractérisée par de nombreux symptômes dont une surdit é neurosensorielle dans la majorité des cas. Dans cette maladie, le gène codant pour la protéine ALMS1 –normalement exprimée au niveau du corps basal des cellules ciliées et des cellules de soutien de la cochlée – est muté (Jagger, Collin et al. 2011).

Ce projet est centré sur l'utilisation de de cellules souches humaines à pluripotence induite (hiPS) normales ou mutées (dérivées de fibroblastes de patients sourds atteints du syndrome d'Alström) afin de développer :

1/ un modèle humain unique permettant de caractériser les intervenants moléculaires du développement cochléaire et

2/ un modèle cellulaire humain de surdit é génétique pour l'exploration des mécanismes moléculaires et cellulaires de la surdit é et à terme l'identification de molécules thérapeutiques.

Afin d'éliminer tous les effets épigénétiques et les défauts de différenciation éventuels entre deux lignées hiPSs dérivées de patients différents, la correction du génome des hiPSs mutées et la création d'une lignée dites « isogéniques » sera utilisée pour la mise au point du protocole de différenciation et considérée comme standard de référence pour l'étude de la pathologie. Ainsi, notre travail devrait permettre de contribuer à une meilleure compréhension du développement de l'oreille interne humaine en condition normale ou pathologique.

A terme, la différenciation des hiPSCs normales et mutées en cellules cochléaires représenterait le premier modèle humain de surdit é génétique.

MATERIELS & METHODE

Matériels et méthode

1. Génération des cellules hiPS

Les fibroblastes humains ont été obtenus grâce à une collaboration avec le Dr. Gabriella Milan de l'Université de Padoue (Italie). La lignée ALMS provient d'une biopsie de peau d'un homme de 36 ans sourd, souffrant du syndrome d'Alström (patient n°2 (PT2) dans Zulato et al., 2011). Les fibroblastes sont maintenus sur un coating de gélatine (0,1%) dans du milieu « FIBRO » : DMEM (Gibco ; 41965039) avec 10% de FBS (Gibco ; 10270-098), 1% d'acides aminés non essentiels (Gibco ; 11140-035), 1% de Pénicilline/Streptomycine (Gibco ; 15140122) et 0,1mM de β -mercaptoéthanol (Sigma ; M7522-100).

La génération des cellules hiPS à partir des fibroblastes humains est réalisée en laboratoire de biosécurité de niveau 2 avec le kit de reprogrammation CitoTune Sendai Vector (Invitrogen) selon les instructions du fabricant. 100 000 fibroblastes sont reprogrammés dans un puits d'une plaque 6 puits avec une MOI (pour « multiplicity of infection ») de 3 dans 3ml de milieu « FIBRO » contenant 4ng/ml FGF2 (Peprotech ; 100-18B ; ci-après « FIBRO-FGF »). Le jour suivant l'infection, le milieu contenant les particules virales est rincé une fois avec du DMEM (Gibco ; 41965039) et remplacé avec du milieu FIBRO-FGF2. Le 4^{ème} jour après l'infection, les cellules sont détachées par un traitement à la Trypsine-EDTA (Gibco ; 25300-054) pendant 20min à 37°C et transférées dans 3 puits d'une plaque 6 puits préalablement coâtés de fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) (Millipore ; PMEF-CFL) irradiés (25Gy pendant 20min), dans du milieu FIBRO-FGF et 10 μ M de Y-27632 (VWR, 688000-1). A partir du 5^{ème} jour après l'infection, le milieu FIBRO-FGF est remplacé par du milieu « KSR-FGF » : DMEM/F12 (Gibco ; 31331), 20% sérum remplacement knock-out (KO-SR) (Gibco ; 10828), 1% d'acides aminés non essentiels (Gibco ; 11140-035), 0,1mM de β -mercaptoéthanol (Sigma ; M7522-100) et 4ng/ml FGF2 (Peprotech ; 100-18B) et ensuite changé tous les jours. Du 5^{ème} au 15^{ème} jour après infection, 10 μ M de Y-27632 et 0,5mM d'acide valproïque (VPA ; Sigma ; P4543) sont ajoutés au milieu KSR. Les colonies de cellules hiPS reprogrammées apparaissent environs deux semaines après l'infection et sont tout d'abord visualisées en temps réel en présence du marqueur de cellules souches TRA1-60 couplé à un fluorochrome Alexa fluor 488 (Life Technologies, A25618). Les colonies TRA1-60 positives sont détachées mécaniquement une à une et transférées (de manière clonale) sur des MEFs fraîchement irradiés en présence de

milieu KSR-FGF. Les propriétés de pluripotence des hiPS sont ensuite caractérisées comme décrit pour les cellules hES (Thomson et al., 1998 ; Yu et al., 1998).

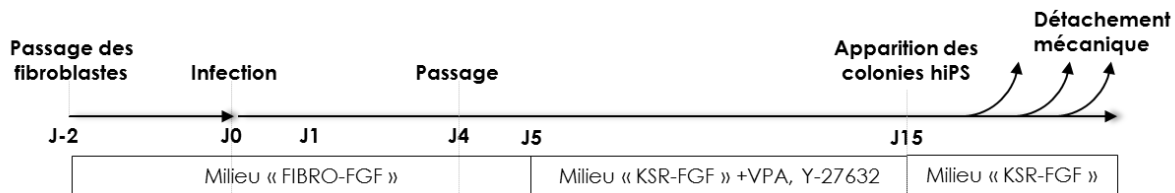


Figure 32 : Protocole de génération des hiPS.

2. Culture des cellules hiPS

Les lignées de cellules hiPS sont maintenues sur des MEFs mitotiquement inactivées par irradiation ou par traitement à la mitomycine C 10µg/ml pendant 2h30 (Sigma ; 4287). Les cellules hiPS sont cultivées dans le milieu KSR-FGF. Les cellules sont transférées chaque semaine sur des MEFs fraîchement inactivés et maintenus dans un incubateur à 37 ° C.

Pour les expériences de modifications du génome (voir CRISPR/Cas), les cellules hiPS sont maintenues sur Geltrex (Gibco ; A14133-02) dans du milieu KSR conditionné en présence de MEFs pendant 24h appelé « KSR conditionné » avec 4ng/ml de FGF2.

3. Différenciation spontanée en 3 feuillets embryonnaires

Les cellules sont détachées par un traitement à la collagénase A 1mg/ml (Roche ; 11 088 858 001) pendant 20min à 37°C puis transférées dans une boîte de culture non adhérente dans du milieu KSR sans morphogène. Le milieu est remplacé tous les 2 jours par du KSR frais. Après 7 jours, les cellules forment des agrégats flottant appelés corps embryoïdes (EBs pour « embryoids bodies ») qui sont mis en culture en condition adhérente pendant 7 jours dans des boîtes de culture recouvertes de gélatine dans du KSR sans morphogène, avant d'être fixées avec de la paraformaldéhyde (4% dans du PBS) et immunomarquées avec les anticorps primaires de souris anti-PAX6 à 1 :1000 (DHSB ; AB_528427), anti-SOX17 de chèvre à 1:50 (R&D Systems ; AF1924) et anti-BRACHYURY de lapin à 1:100 (Abcam ; ab20680) comme décrit plus bas.

4. Génération de tératome

La génération des tératomes à partir des cellules hiPS est réalisée avec l'approbation de la commission d'éthique de l'utilisation des animaux à l'ULg (dossier n°11-1133). 10^6 hiPS sont suspendues dans 100µl d'un mélange 50:50 de DMEM/F12 (Gibco ; 31331) et Matrigel (BD Biosciences ; 354277) puis injectées en sous-cutané au niveau de la cuisse arrière d'une souris immunodéficiente (SCID-beige, mâles âgés de 8 semaines, Laboratoires Charles River). Les souris sont ensuite gardées sous conditions protectrices sans pathogènes pendant maximum 8 semaines. Après le sacrifice des animaux, les tumeurs sont disséquées, fixées pendant une nuit dans du PBS avec 4% de paraformaldéhyde, déshydratées dans une solution de 30% de sucrose et enchâssées dans de la paraffine. En collaboration avec le service d'anatomo-pathologie du CHU de Liège (Pr. Delvenne), des coupes de 12µm d'épaisseur sont effectuées au microtome puis colorées avec de l'hématoxyline et de l'éosine et observées à l'aide d'un microscope Leica DMIL LED permettant l'analyse histologique

5. Caryotype

Les divisions cellulaires sont bloquées en métaphase par l'ajout de 0,1µg/ml de colcémide (Life Technologies ; 15210-040) au milieu de culture pendant 3h à 37°C. Les membranes nucléaires sont cassées par un traitement d'une solution hypotonique de KCl 75mM pendant 15min à 37°C. Les cellules sont ensuite fixées par un mélange 3:1 de méthanol et d'acide acétique glacial (fraichement préparé). Les anomalies chromosomiques éventuelles des cellules hiPS sont ensuite observées après coloration en G-banding Wright (Merck ; 1.01383.2500), sur la plateforme Leica Cytovision GSL120.

6. Différenciation

- Génération d'EB et induction otique

Pour induire la formation de corps embryoides (EB), les cellules hiPS non différenciées sont dissociées avec de l'acutase (StemCell Technologies ; 07920) pendant 20min à 37°C et 750000 cellules sont transférées dans une boîte de Pétri 100mm non adhérente contenant le milieu KSR

(sans FGF2), avec 10 μ M Y-27632, 100ng/ml DKK1 (Peprotech ; 120-30), 10 μ M SB431542 (Sigma) et 10ng/mL d'IGF1 (Peprotech ; 100-11). Chaque jour, les cellules sont transférées dans une nouvelle boîte de culture et la moitié du milieu est remplacé par du milieu frais. Il en résulte la formation d'EB flottants. Les EB sont cultivés pendant 6 jours en condition flottante puis sont des boîtes de culture recouvertes de poly-L-ornitine 0,1mg/ml (Sigma ; P4957) et laminine 10 μ g/ml (Sigma ; L2020) afin de leur permettre d'adhérer. Le milieu est remplacé par du DMEM/F12 avec 1% N2 et 100ng/ml FGF2 et 50ng/ml héparine sulfate (HS), tous les 2 jours pendant 14 jours. Du SU5402 10 μ M (BioVision ; 1645-05), un inhibiteur de la voie FGF, est utilisé parallèlement pour les échantillons contrôles jusqu'au jour 20.

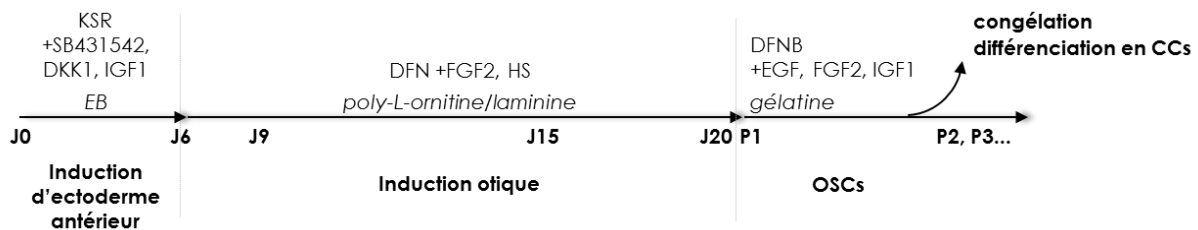


Figure 33 : Les différentes étapes du protocole de différenciation.

- Maintenance des progéniteurs otiques

Après 14 jours de traitement au FGF2, les cellules sont détachées par un traitement rapide à la Trypsine-EDTA (Gibco ; 25300-054) et transférées dans des boîtes de culture recouvertes de gélatine (0,1%). Les cellules peuvent être maintenues en culture dans du DFN (DMEM/F12, 1% N2, 2% B27) avec 20ng/ml EGF, 20ng/ml FGF2 et 50ng/ml IGF1 (ci-après « DFN-EFI »). Durant les premiers jours suivant le passage, un niveau élevé de mort cellulaire est observé.

- Différenciation en cellules cochléaires

Pour l'étape de différenciation terminale en cellules cochléaires, les progéniteurs otiques sont transférés sur des cellules embryonnaires otiques de souris (E14). Les cellules mésenchymateuses sont préparées à partir de 20 cochlées. Après dissection, les cochlées sont incubées dans de la papaine 20u/ml (Worthington) en présence de 0,05% DNase (Worthington) pendant 30min à 37°C. La dissociation enzymatique est arrêtée par l'ajout d'ovomucoïde (Sigma ; T2011). Les cellules sont ensuite dissociées mécaniquement. Après dissociation, les cellules sont transférées

(10 000 cellules/cm²) dans des boîtes de culture recouvertes de poly-L-orнитine 0,1mg/ml et laminine 10µg/ml dans du milieu DMEM/F12 contenant 2% de B27, 10ng/ml FGF2 et 20ng/ml EGF pendant 4 à 6 jours. Ensuite, les progéniteurs otiques humains sont transférés sur les cellules nourricières de souris, et laissées en condition adhérente pendant 24h dans du DFNB-EFI. Après 24h, les morphogènes sont retirés du milieu et les cellules sont cultivées dans du DFNB, changé tous les jours, pendant 10 jours.

7. RT-PCR quantitative

Les ARNs totaux sont isolés en utilisant du Trizol (Invitrogen ; 15596026) et sont rétro-transcrits en ADNc en utilisant la Superscript III (Invitrogen). La PCR quantitative est ensuite effectuée sur une machine LightCycler 480 (Roche) avec du SYBR Green (Roche ; 04913850001) et analysée avec le programme LightCycler 480 IDEAS 2.0 (Roche).

Les amorces utilisées sont reprises dans le Tableau 4 ci-dessous :

Gène	FOR	REV
OCT4 endogène	AGTTTGTGCCAGGGTTTTTG	ACTTCACCTTCCCTCCAACC
SOX2 endogène	GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAGAGG	TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG
OCT4 SeV	CCCGAAAGAGAAAGCGAACCAG	AATGTATCGAAGGTGCTCAA
Sox2 SeV	ACAAGAGAAAAACATGTATGG	ATGCGCTGGTTCACGCCCGCGCCCAGG
Klf4 SeV	ACAAGAGAAAAACATGTATGG	CGCGCTGGCAGGGCCGCTGCTCGAC
cMYC SeV	ACAAGAGAAAAACATGTATGG	TCCACATACAGTCTGGATGATGATG
NANOG	TGAACCTCAGCTACAAACAG	TGGTGGTAGGAAGAGTAAAG
SOX2	AGCTACAGCATGATGCAGGA	GGTCATGGAGTTGACTGCA
GAPDH	GCATCTTCTTTGCGTCGC	CCAAATGCGTTGACTCCGA
PPIA	CCAACACAAATGGTCCCAAGT	CCATGGCCTCCACAATATCA
OCT4	TGGGCTCGAGAAGGATGTG	GCATAGTCGCTGCTTGATCG
PAX6	CCAGAAAGGATGCCTCATAAAGG	TCTGCGCGCCCCTAGTTA
SOX1	CTCATGTAGCCCTGCGAGTTG	ATGCACCGTACGACATGG
PAX2	GAVTATGTTGCGCTGGGAGATTC	AAGGCTGCTGAACTTTGGTCCG
PAX8	ACCAAAGGCGAGCAGGAAGTGA	TCAGCAAGCTGGAGTTGGGGAA
SIX1	TTCCTTCCAATGCAGAGATCAGGG	AGGCTGCTGAAACAGGCGTATCAG
EYA1	ACCCCTGATCACAGGTGCAAACATC	ACTGCTCCCAATTGCTGAACTGA
CDK1	GGAAACCAGGAAGCCTAGCATC	GGATGATTCAGTGCCATTTTGCC
CCNA2	CTCTACACAGTCACGGGACAAAG	CTGTGGTGCTTTGAGGTAGGTC
CCNB1	GACCTGTGTCAGGCTTTCTCTG	GGTATTTGGTCTGACTGCTTGC
CCNB2	CAACCAGAGCAGCACAAAGTAGC	GGAGCCAACCTTTCCATCTGTAC
CCNE2	CTTACGTCAGTATGGTGCTTGC	CTTGGAGAAAGAGATTTAGCCAGG
RRM2	CTGGCTCAAGAAACGAGGACTG	CTCTCCTCCGATGGTTTGTGTAC
HELLS	GATTTGGATCGAATGCTGCCAG	ATGGACCCATCAAGCCTGCTGA
GINS2	AGCCAAACTCCGAGTGTCTGCT	CTTGTGTGAGGAAAGTCCCGCT
PRIM2A	CTCAGCCTCTGCTCAATCACC	GTAAGTACGCATGCAAGGTGG
TOP1	GAACAAGCAGCCCAGGATGAT	TGCTGTAGCGTATGGAGGCAT

Tableau 4 : Liste des amorces de qRT-PCR utilisées au cours de ce travail.

Les données sont ensuite normalisées par rapport à l'expression du gène GAPDH ou du gène PPIA. Les données sont présentées comme valeurs moyennes \pm SEM avec le nombre d'expériences indépendantes (n) indiquées. Les réactions PCR sont réalisées en triplicatas et les valeurs représentent la moyenne de 3 à 6 expériences indépendantes.

8. Immunomarquages

Les cellules sont fixées avec 4% de paraformaldéhyde dans du PBS (phosphate-buffered saline) pendant 10min à 4°C. Les sites de liaison non spécifiques sont bloqués pendant 30min à température ambiante avec une solution de PBS contenant 0,3% de triton X-100 et 5% de sérum d'âne (Jakson ImmunoResearch Lab ; 017-000-121). Les cellules sont incubées pendant une nuit à 4°C avec les anticorps primaires repris dans le Tableau 5 :

Anticorps	Hôte	Dilution	Référence
anti-PAX2	lapin	1:100	Covance ; PRB-276P
anti-PAX8	chèvre	1:50	Abcam ; ab13611
anti-PAX8	chèvre	1:100	hermoscientific ; PA5-18069
anti-SIX1	souris	1:50	Sigma ; SAB1402356
anti-SIX1	chèvre	1:100	Santa Cruz ; sc-9709
anti-Caspase3	lapin	1:500	Promega ; G7481
anti-parvalbumine	souris	1:250	Sigma ; P-3088
anti-ATOH1	lapin	1:100	Abcam ; ab75354
anti-MYOSINE6 (K-20)	chèvre	1:100	Santa Cruz ; sc-23568
anti-MYOSINE6	lapin	1:100	Santa Cruz ; sc-50461
anti-ALMS1 (N-term)	lapin	1:100	donation de Hearn et al, 2005
anti-ALMS1 (N-term)	lapin	1:100	Abcam ; ab84892
anti-ALMS1 (C-term)	chèvre	1:100	Abcam ; ab4306
anti-Arl13b	souris	1:200	Antibodies Inc. ; 75-287
anti-SOX2	chèvre	1:200	Santa Cruz ; sc-17320
anti-SOX2	lapin	1:200	Millipore ; AB5603
anti-SOX9	lapin	1:100	Millipore, AB5535
anti-OCT4	lapin	1:500	Cell Signaling ; 2890
anti-NANOG	chèvre	1:500	R&D Systems, AF1997
anti-Sendai virus	souris	1:500	MBL ; PD029
anti-TRA1-60	souris	1:100	Millipore ; MAB4360
, anti-SOX1	chèvre	1:500	R&D Systems ; AF3369
anti-SOX1	lapin	1:500	Millipore ; AB15766
anti-N-cadhérine	souris	1:1000	BD Transduction Lab ; 610920
anti-TRA1-81	souris	1:100	Millipore ; MAB4381-20

Tableau 5 : Liste des anticorps primaires utilisés au cours de ce travail.

Après trois rinçages de 5min au PBS, les cellules sont incubées avec les anticorps secondaires produits chez l'âne, conjugués au fluorochrome Alexa Fluor 488, 555 et 647 (Jackson ImmunoResearch Lab). Les noyaux sont marqués avec le HOECHST33342 (Molecular Probes). Les lamelles sont montées sur lames et les images sont acquises sur un microscope confocal Nikon A1R. Les comptages sont réalisés avec le programme ImageJ sur plusieurs champs pris au hasard sur minimum 2 échantillons/expérience et minimum 3 expériences différentes sont réalisées. Tous les comptages sont normalisés sur le nombre de noyaux visualisés à l'aide du HOECHST 33342. Pour le comptage des co-marquages, le nombre de cellules double positives sont comptabilisées et normalisées sur le nombre de noyaux marqué par le HOECHST33342.

9. Marquage au FM1-43

Le FM1-43 est un fluorochrome utilisé pour étudier la mécano-transduction des cellules ciliées différenciées (Kawashima et al., 2011; Nishikawa and Sasaki, 1996). Les cellules sont rincées 3x puis incubées 15min avec du tampon DPBS. Ensuite, le FM1-43 est ajouté aux cellules à la concentration finale de 5µg/ml pendant 10sec. Les cellules sont rincées au PBS avant d'être fixées avec du PBS contenant 4% de paraformaldéhyde à 4°C pendant 10min. Les cellules sont ensuite immunomarquées avec les anticorps primaires de souris anti-noyaux humains à 1 :100 (Millipore ; MAB4383).

10. Cycle cellulaire et prolifération

Pour étudier la prolifération à différents stades de différenciation, les cellules sont incubées dans leur milieu de culture respectif en présence de BrdU pendant 2h (hiPS), 4h (progéniteur) et toute une nuit (cellule cochléaire). Les cellules sont ensuite fixées avec de la paraformaldéhyde 4%. Les épitopes antigéniques sont démasqués par un traitement de 10min à 37°C avec du HCl 2N suivit d'un traitement à l'acide borique 0,1mM, pH 8,5 de 5min à température ambiante. Les cellules sont ensuite immunomarquées avec les anticorps primaires de rat anti-BrdU à 1:500 (AbD Serotec ; OBT0030), de souris anti-Ki67 à 1:500 (BD Pharmingen ; 550609) et anti-pHH3 de lapin à 1:100 (UpState ; 06-570) comme décrit plus haut. Le nombre de cellules en prolifération (Ki67 positives), en phase S (en réplication, BrdU positives) et M (en mitose, pHH3 positives) du cycle cellulaire est ensuite quantifié et normalisé sur le nombre total de cellules marquées par le HOECHST33342.

Pour étudier le cycle cellulaire, environ 1 million de cellules non-confluentes sont détachées et lavées deux fois au PBS avant d'être fixées avec de l'éthanol 70% froid pendant 30 minutes à -20°C ou pendant une nuit à 4 ° C. Les cellules sont ensuite lavées trois fois avec du PBS, perméabilisées avec du PBS-Triton X-100 à 0,25% sur de la glace pendant 15 min et incubées avec l'anticorps primaire de lapin anti-pHH3 à 1:100 (Cell Signaling ; 9701) dans 100µl de PBS avec 5% de sérum d'âne pendant 2 heures sous agitation modérée. Les cellules sont lavées une fois avec du PBS et incubées avec un anticorps secondaire conjugué à un Alexa488 (Invitrogen) à 1:500 dans du PBS avec 5% de sérum d'âne pendant 1 heure, sous agitation modérée. Les

cellules sont ensuite traitées à la RNase A pendant 30 min à 37°C (Thermo Scientific), et l'iodure de propidium (Sigma-Aldrich) est ajouté juste avant le tri cellulaire. L'acquisition est réalisée sur le FACSAria III (BD Biosciences) de la plateforme Imagerie du GIGA (ULg) et analysée avec le programme Mod Fit.

11. Mort par apoptose

Pour étudier la mort cellulaire par apoptose, environ 500 000 cellules non-confluentes sont détachées et lavées deux fois au PBS avant d'être incubées dans 500µl de tampon de resuspension (kit Abnova ; KA0712) avec 5µl d'un anticorps anti-Annexine V couplé au Cy5 juste avant le tri cellulaire. L'acquisition est réalisée sur le FACSCalibur (BD Biosciences) de la plateforme Imagerie du GIGA (ULg).

12. Longueur du cil primaire

Pour étudier la longueur du cil primaire à différent stade de différenciation, les cellules sont laissées à confluence puis sans morphogène pendant 48h avant d'être fixées avec du méthanol froid (-20°C) pendant 10min. Les cellules sont ensuite immunomarquées avec les anticorps primaires de lapin anti-alpha TUBULINE acétylée (anti-AcTUB) 1:500 (Sigma ; T7451) et de souris anti-gamma TUBULINE 1:500 (GTU-88) (Abcam ; ab-11316) comme décrit plus haut. La longueur des cils est mesurée et le nombre de cellules développant un cil est comptabilisé à l'aide du programme ImageJ. Les statistiques sont réalisées sur minimum 3 expériences indépendantes où n est le nombre total de cils comptabilisés.

13. Edition du génome des cellules hiPS par CRISPR/Cas9

Les expériences d'édition du génome sont réalisées comme décrites dans Grobarczyk et al, 2015. Brièvement, 200 000 cellules hiPS sont nucléofectées dans un volume total de 20µl de solution 1

du kit Amaxa primary cell P3 (Lonza) et le Nucleofector 4D (Lonza) selon les indications du fabricant, avec 1,5µg de chaque plasmide : pLCAS9 (Addgene ; 44719), pLgRNA (Addgene, 41824) contenant un gène de résistance à la gentamycine et un plasmide pJET1.2 contenant l'ADN correcteur. Le plasmide pLgRNA est construit selon le protocole de Church et al. (Addgene). Les oligos (Tableau 6) sont resuspendus à 100µM dans de l'eau stérile et sont hybridés (1µl) dans du tampon d'hybridation puis insérés dans le plasmide pLgRNA vide.

Oligos	
FOR	TTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAGGACGAAACACCGGACTAGCAGACCAGAAGAC
REV	GACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTCTAGCTCTAAAACGCTTCTGGTCTGCTAGTCC

Tableau 6 : Oligos utilisés pour la construction de l'ARNg#1

Pour construire le plasmide correcteur, l'ADN génomique de cellules hiPS WT est extrait et 3000pb du gène ALMS1 (correspondant au locus muté chez les patients) sont amplifiées avec les amorces : ALMS1-3000-For (TCAGTTGGCTGTAAGTTCTCCT) et ALMS1-3000-Rev (TCCAAATGAGCTGGAAGGGG). Les produits PCR sont purifiés avec le kit QIAquick PCR purification kit (Qiagen ; 28106) puis insérées dans le plasmide pJET1.2 avec le kit cloneJET PCR cloning (Thermoscientific ; K1231) selon les instructions du fabricant. Tous les plasmides sont séquencés pour détecter d'éventuelles mutations. La fonctionnalité du complexe CAS9/ARNg est testée en transfectant les plasmides encodant la CAS9 et l'ARNg dans des HEK293T comme décrit dans Grobarczyk et al., 2015. Brièvement, 48h après transfection, l'ADN génomique est extrait des cellules et le locus ALMS1 est amplifié par PCR. Après une étape de dénaturation/appariement, l'ADN est digéré par l'enzyme T7E1 (New England Biolabs, M0302S) pour mettre en évidence d'éventuelles cassures dans l'ADN. Le pourcentage de coupure est calculé par quantification de l'intensité des bandes après migration sur gel d'agarose, avec le programme ImageJ (comme décrit dans Grobarczyk et al, 2015). Après validation du complexe CAS9/ARNg, les cellules hiPS ALMS sont nucléofectées avec les trois plasmides (CAS9, ARNg et donneur ALMS1 WT) pour corriger la mutation. Après nucléofection, les cellules sont transférées dans une boîte de culture 100mm recouverte de Geltrex (Gibco ; A14133-02) dans du milieu KSR conditionné avec 4ng/ml de FGF2 et 10mM de Y-27632. Le lendemain, le milieu est changé avec du milieu frais et, 2 jours après la nucléofection, les cellules sont sélectionnées avec 100µg/ml de gentamycine (G418) pendant 24h. Le milieu est ensuite remplacé tous les jours par du KSR conditionné avec 4ng/ml de FGF2 jusqu'à l'apparition des colonies (2 semaines environs). Les colonies sont ensuite détachées une

par une et transférées dans une plaque 24 puits recouverte de Geltrex dans du KSR conditionné avec 4ng/ml de FGF2. L'ADN génomique est extrait des cellules avec le kit DNeasy Blood and tissue kit (Qiagen ; 69504) selon les indications du fabricant et le locus muté du gène ALMS1 est amplifié avec les amorces : ALMS1-For (CCCACAGAGGGAGAAGCCTA) et ALMS1-Rev (AGCTGGTCCAAGAACAGGTG) puis envoyé pour séquençage à la plateforme de génomique du GIGA (ULg).

RESULTATS

Résultats

1. Génération et caractérisation d'hiPSCs mutées dérivées de patients atteints de surdité génétique

Pour développer un modèle cellulaire le plus proche de la pathologie humaine, nous avons généré avec succès des hiPSCs à partir de fibroblastes, obtenus à partir de biopsies cutanées de patients sourds présentant une mutation du gène *ALMS1* codant pour une protéine éponyme. Le patient PT2 possède une mutation homozygote récessive au niveau de l'exon 8 du gène *ALMS1* décrites dans Zulato et al., 2011 et illustrées Figure 34 .

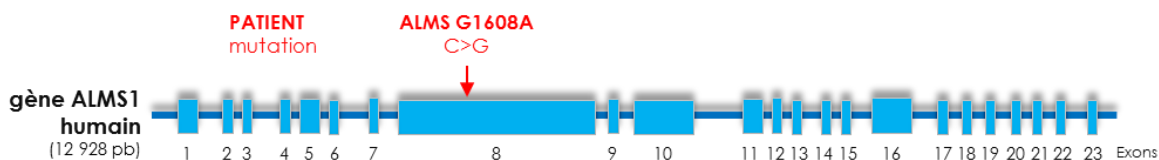


Figure 34 : Le gène *ALMS1* humain est composé de 12 928pb et 23 exons. Le patient sourd PT2 est porteur de la mutation ponctuelle homozygote récessive C>G (en rouge) qui conduit à un codon STOP prématuré.

Les cellules hiPS *ALMS* mutées ont été générées à l'aide du virus Sendai à ARNm, non intégratif, encodant pour les facteurs de transcription OCT4, SOX2, KLF4 et cMYC (Fusaki et al., 2009). L'apparition des colonies d'hiPS reprogrammées est suivie en temps réel à l'aide du fluorochrome membranaire TRA1-60 à partir du 10^{ème} jour après l'infection (Figure 35). Les colonies positives pour le marqueur TRA1-60 sont transférées mécaniquement de manière clonale dans une autre boîte de culture.

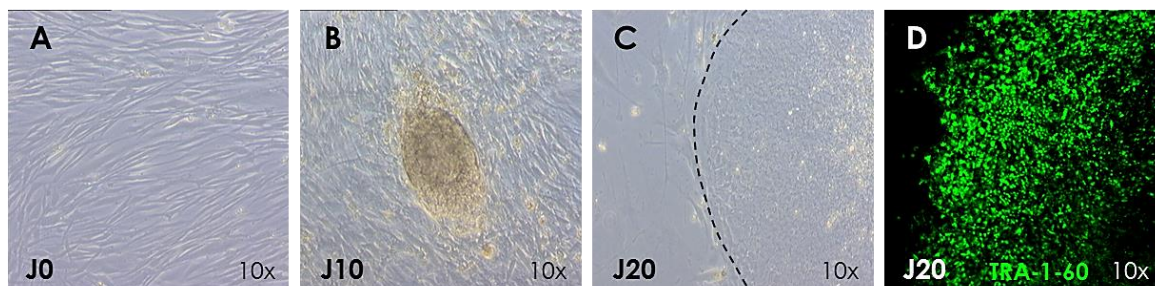


Figure 35: Reprogrammation des fibroblastes du patient PT2 en cellules hiPS *ALMS*. A : Fibroblastes du patient PT2 en culture, visualisés en microscopie optique le jour de l'infection (J0). B-C : Apparition des premières colonies hiPS *ALMS*, 10 jours après

l'infection (J10, B) et 20 jours après l'infection (J20, pointillés C). D : L'apparition des colonies hiPS est suivie en temps réel par la visualisation du marqueur membranaire de cellules hES, TRA1-60, en microscopie à épifluorescence.

A partir du 6^{ème} passage (P6) des hiPS en culture, la présence de particules résiduelles de virus du Sendai a été testée. Au-delà de P6, nous ne détectons plus aucune particule virale Sendai dans le cytoplasme de ces cellules hiPS ALMS par IF (Figure 36).

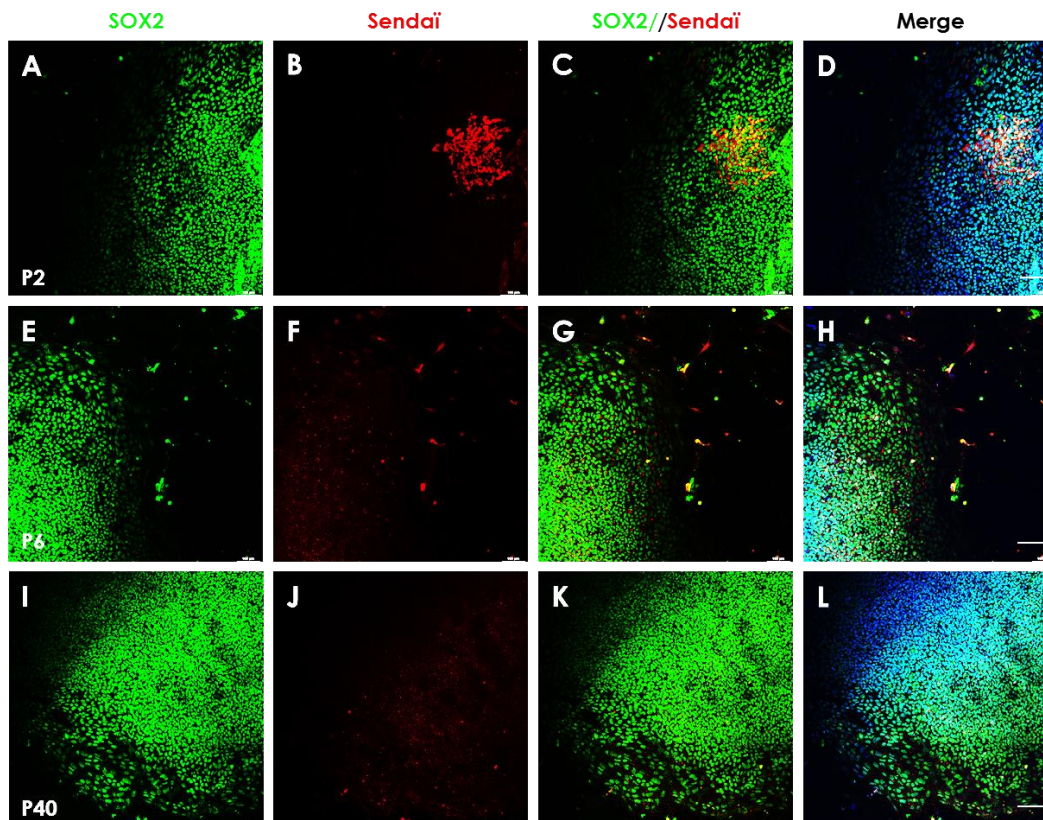


Figure 36: Dégradation des particules du virus Sendai présentes dans les hiPS ALMS. A-D : Après 2 passages en culture (P2), les cellules hiPS ALMS positives pour le marqueur de pluripotence SOX2 (A), contiennent toujours des particules virales résiduelles du Sendai (« Sendai ») (B). E-H : A partir du 6^{ème} passage (P6), plus aucune particule virale n'est détectée dans les hiPS ALMS. I-L : Idem après 40 passages (P40). Les noyaux sont marqués au HOECHST (D, H, L). Barres d'échelle = 100µm.

Les colonies de cellules hiPS correctement reprogrammées expriment les marqueurs de pluripotence et d'autorenouvellement caractéristiques des cellules hES. Après 10 passages en culture, les colonies d'hiPSCs ALMS mutées ainsi obtenues ont été validées par IF et RT-PCR quantitative en regardant l'expression de marqueurs moléculaires de pluripotence et d'autorenouvellement endogènes tels que NANOG, OCT4, SOX2 et TRA1-81 (Figure 37). Alors que les fibroblastes dont elles proviennent n'expriment aucun marqueur de pluripotence, ceux-ci

sont exprimés par les cellules hiPS ALMS mutée, de la même manière que dans les hES contrôles et une lignée de cellule hiPS WT déjà disponible au laboratoire (Figure 37, E). Ces résultats suggèrent que la principale voie endogène de pluripotence a été réactivée correctement dans les colonies hiPS ALMS mutées.

La reprogrammation et le maintien des cellules hiPS en culture peuvent engendrer des réarrangements chromosomiques (Mayshar et al., 2010). Nous avons donc vérifié l'intégrité du génome des hiPS générées par caryotypage et aucune anomalie chromosomique n'a été observée (Figure 37, F).

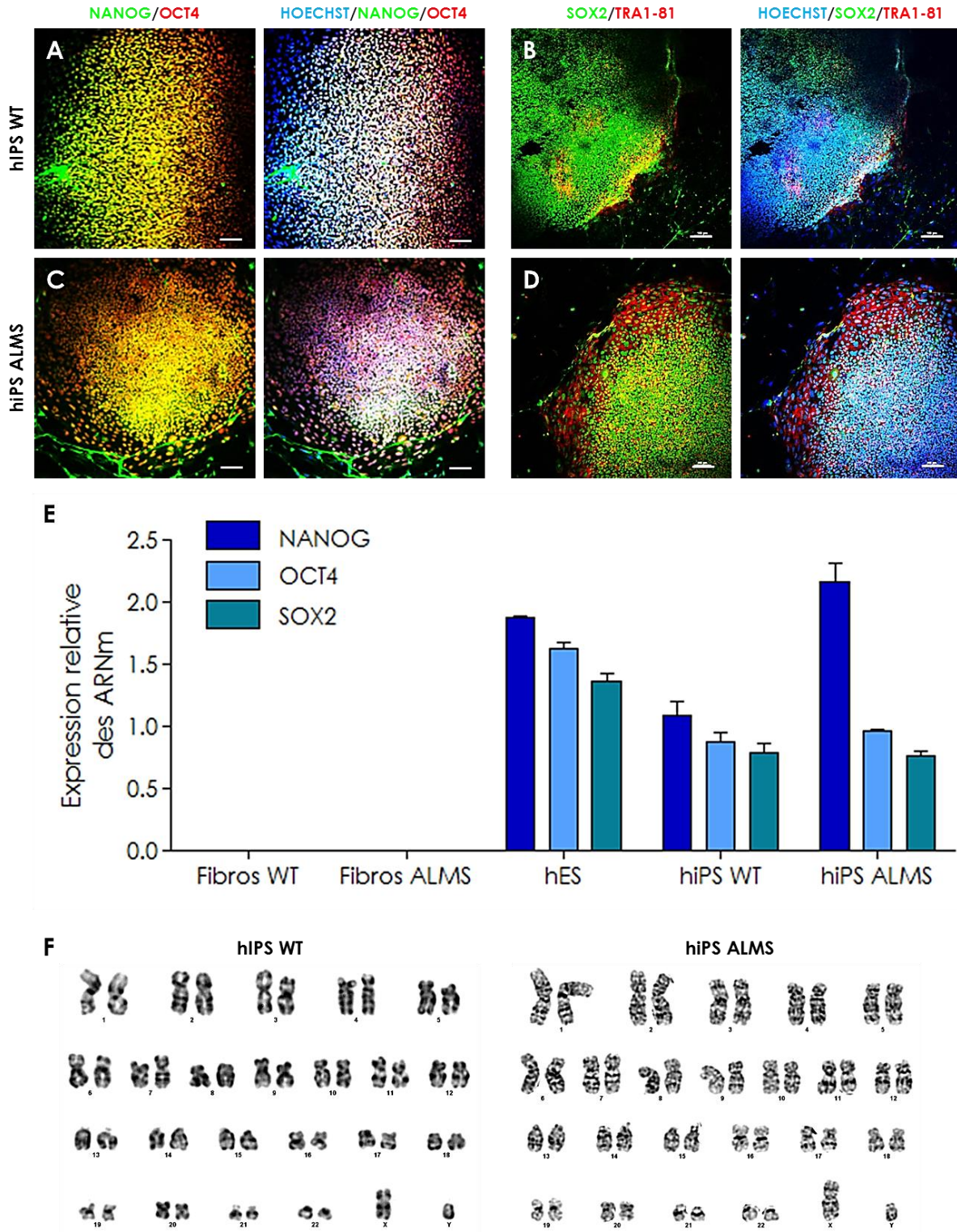


Figure 37: Validation des hiPS ALMS. A-D : Par IF, les colonies hiPS WT contrôles (A, B) et ALMS mutées (C, D) expriment les marqueurs de pluripotence nucléaire NANOG, SOX2 (en vert), OCT4 et membranaire TRA1-81 (en rouge). Les noyaux sont marqués au HOECHST33342. Barres d'échelle = 100µm. E : RT-PCR quantitative des gènes endogènes de pluripotence. Les fibroblastes WT et ALMS sont utilisés comme contrôles négatifs des hiPS WT et ALMS respectivement et les cellules hES

comme contrôle positif. Les amorces utilisées sont spécifiques des gènes endogènes (Fusaki et al., 2009). N=3 expériences indépendantes. Barres d'erreur = SEM. F : Caryotype normale des cellules hiPS WT et ALMS à bas passage (P30).

Les cellules hiPS sont également caractérisées par la capacité de se différencier en n'importe quelle cellule spécialisée, mis à part les cellules placentaires qui forment un tissu extra-embryonnaire (Thomson et al., 1998 ; Evans and Kaufman, 1981). Ainsi, après retrait des morphogènes du milieu de culture *in vitro*, les hiPS ALMS sont capables de générer spontanément des cellules ayant une identité appartenant aux 3 feuillets embryonnaires. Après immunomarquages, les cellules neurectodermes sont visualisées avec PAX6, les cellules mésodermes avec BRACHYURY et les cellules endodermiques avec SOX17 (Figure 38, A-B). La propriété de pluripotence est également observée *in vivo*. Huit semaines après leur injection dans une souris immunodéficente, les cellules hiPS sont capables de générer un tératome contenant les 3 feuillets embryonnaires visualisés après analyse histologique à l'aide d'une coloration hématoxyline-éosine (Figure 38, C-D). En effet, nous avons observé des rosettes de cellules neurectodermes, des cellules mésodermes (des adipocytes et du muscle). Enfin, des vésicules endodermes primitives étaient également présentes dans les tératomes. Nous pouvons en conclure que les cellules hiPS ALMS que nous avons générées sont pluripotentes.

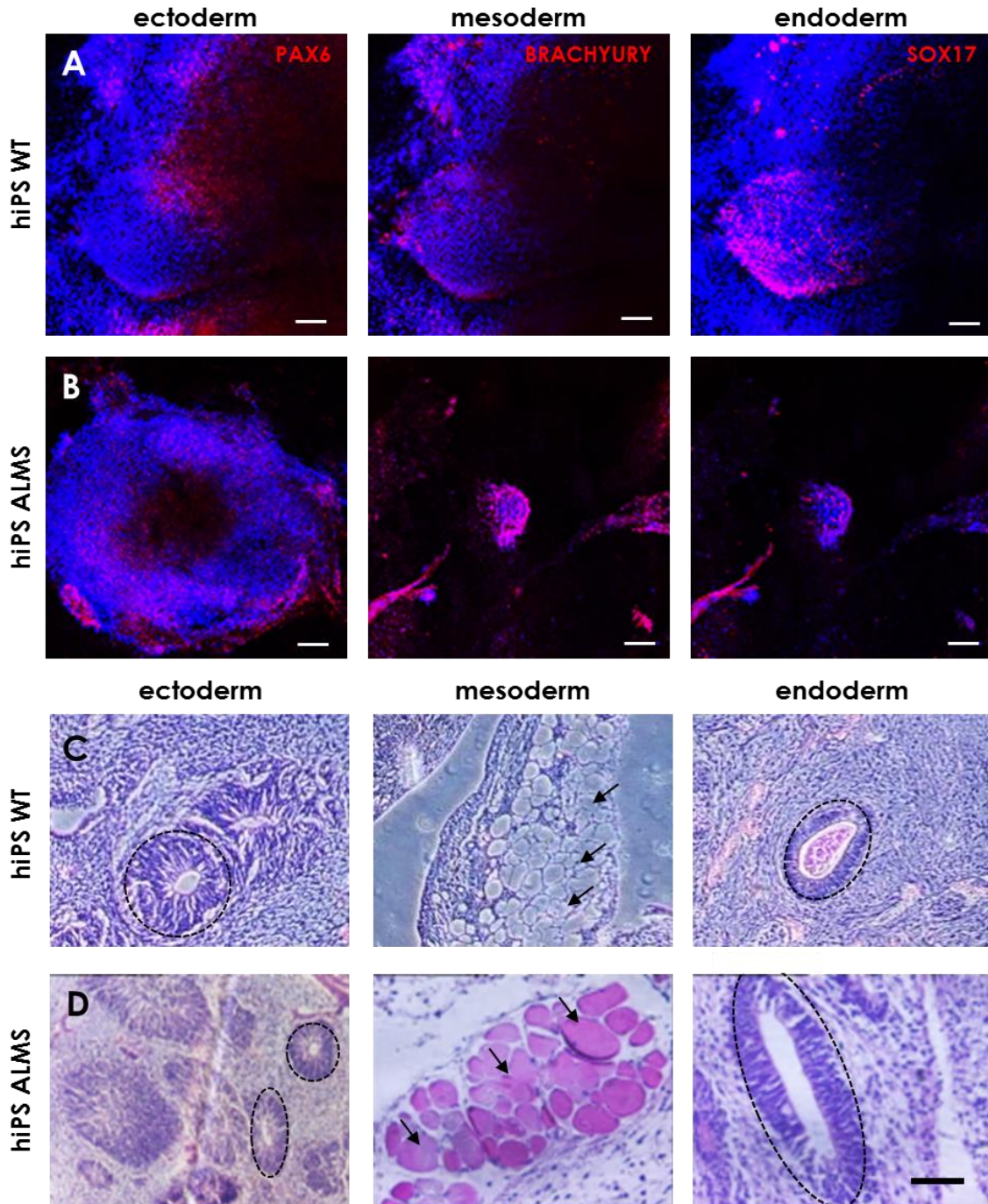


Figure 38: Validation de la pluripotence des hiPS ALMS. A-B : Les cellules hiPS WT contrôle (A) et ALMS (B) sont capables de générer *in vitro* des cellules ectodermiques PAX6 positives, mésodermiques BRACHYURY positive et endodermique SOX17 positives (en rouge). Les noyaux sont marqués au HOECHST33342. Barres d'échelle = 100µm. C-D : Coupes hématoxyline-éosine de tératomes, 8 semaines après injection des cellules hiPS WT contrôles (C) et ALMS (D) dans des souris immunodéficientes. Les hiPS sont capables de générer spontanément des rosettes neuroectodermiques (cercles pointillés), des cellules mésodermiques graisseuses (flèches noires) et musculaires (flèches noires) et des vésicules d'endoderme primitif (cercles pointillés). Barre d'échelle = 100µm.

Enfin, nous avons montré par IF que les hiPSCs ALMS mutées n'expriment plus la protéine ALMS1 (Figure 39, en vert) comme les fibroblastes dont elles proviennent (Zulato et al., 2011) et contrairement aux cellules hiPS WT. La gamma-tubuline (rouge) est utilisée comme co-marquage contrôle du centrosome et les noyaux sont marqués par le HOECHST33342.

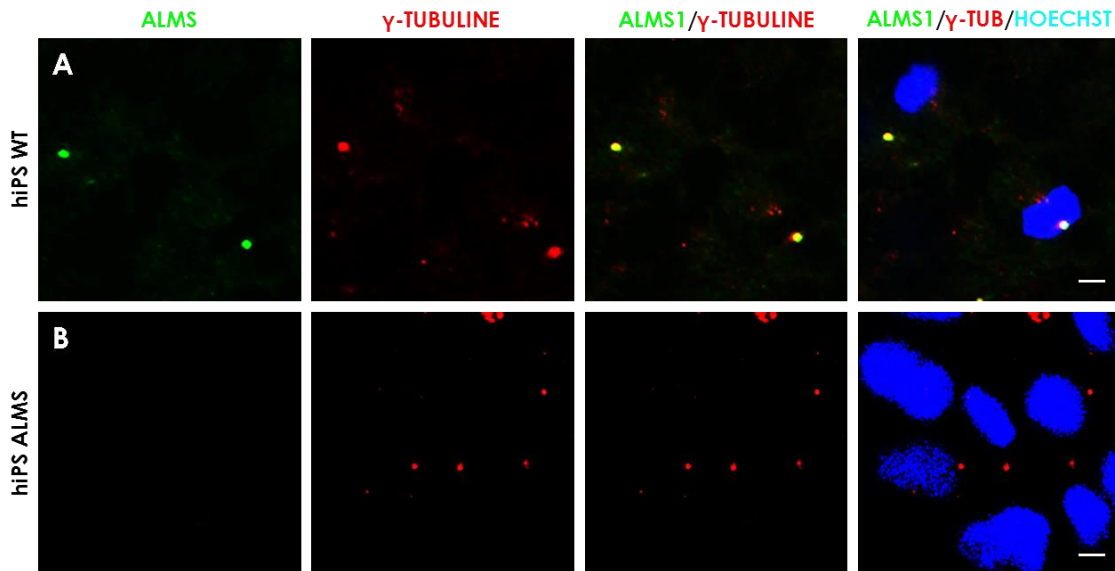


Figure 39: La protéine ALMS1 n'est pas détectée dans les hiPS ALMS. A : Dans les cellules hiPS WT contrôles, la protéine ALMS1 (en vert) co-localise avec la gamma-TUBULINE (en rouge) au niveau du centrosome. B : Les hiPS ALMS mutées n'expriment plus la protéine ALMS1 mais expriment la gamma-TUBULINE (en rouge). Les noyaux sont marqués au HOECHST. Barres d'échelle = 10µm.

Le centrosome constitue le centre organisateur des microtubules. Au cours du cycle cellulaire, à partir de la phase G1, il se duplique de telle sorte que la cellule possède 2 paires de centrioles à l'entrée de G2 (Zou et al., 2005). Pendant toute l'interphase, les deux centrosomes sont liés entre eux par des fibres émanant de leur extrémité proximale basale (où ALMS1 est exprimée) (Lim et al., 2009). Lors de la transition G2-M, les centrosomes se détachent pour permettre la formation du fuseau mitotique et le début de la mitose (Bahe et al., 2005; Fry et al., 1998; Mayor et al., 2002). A la fin de la mitose, chaque cellule possède ainsi son centrosome. Knorz *et al.* ont montré qu'une diminution de l'expression d'ALMS1 par siARN, conduit à une séparation prématurée des centrosomes à partir de la phase G1 (Knorz et al., 2010). Nous avons également observé une séparation anormale des centrosomes dans les hiPS ALMS (Figure 40).

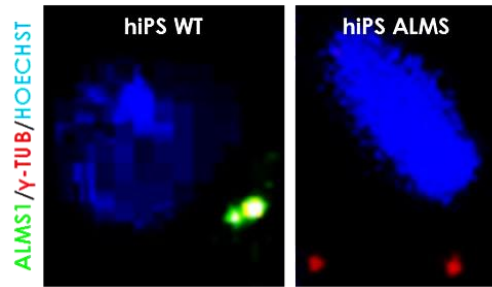


Figure 40: Séparation anormale des centrosomes dans les hiPS ALMS.

Ces résultats suggèrent que les hiPS ALMS provenant de patients sourds atteints du Syndrome d’Alström sont pluripotentes et peuvent être utilisées comme matériel biologique de base pour l’étude et la modélisation de la pathologie.

2. Correction de la mutation des lignées hiPSCs mutées par « genome editing »

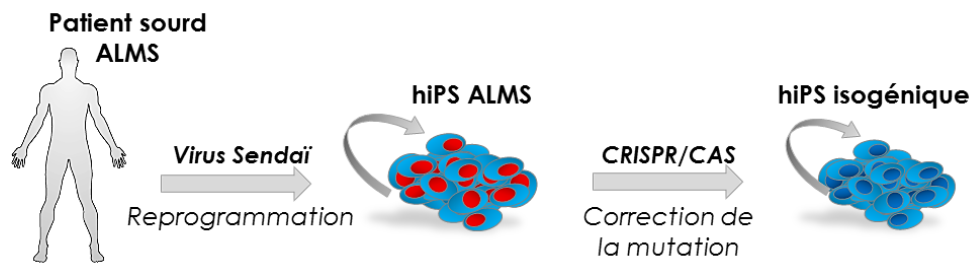


Figure 41: Correction de la mutation ponctuelle des hiPS ALMS par la technique d’édition du génome (CRISPR/CAS9) et génération d’une lignée hiPS isogénique corrigée pour cette mutation. Cette lignée d’hiPS isogénique corrigée sera ensuite utilisée comme référence pour les protocoles de différenciation en cellules cochléaires.

2.1 Construction et validation fonctionnelle du CRISPR/Cas9

Nous utilisons le système CRISPR/Cas9 pour corriger la mutation STOP (exon 8, C>G) du gène ALMS1, dans les cellules hiPS ALMS, par recombinaison homologue et générer un lignée isogénique (Figure 41 et 42).

Les différents vecteurs ont été construits tels que décrit dans Grobarczyk *et al.* (Grobarczyk et al., 2015). Nous avons construit un plasmide donneur ALMS1 WT contenant une séquence d'ADN WT double brin avec deux bras d'homologie de 1500pb de part et d'autre de la mutation a été utilisée comme modèle de réparation par recombinaison homologue (Figure 42, C).

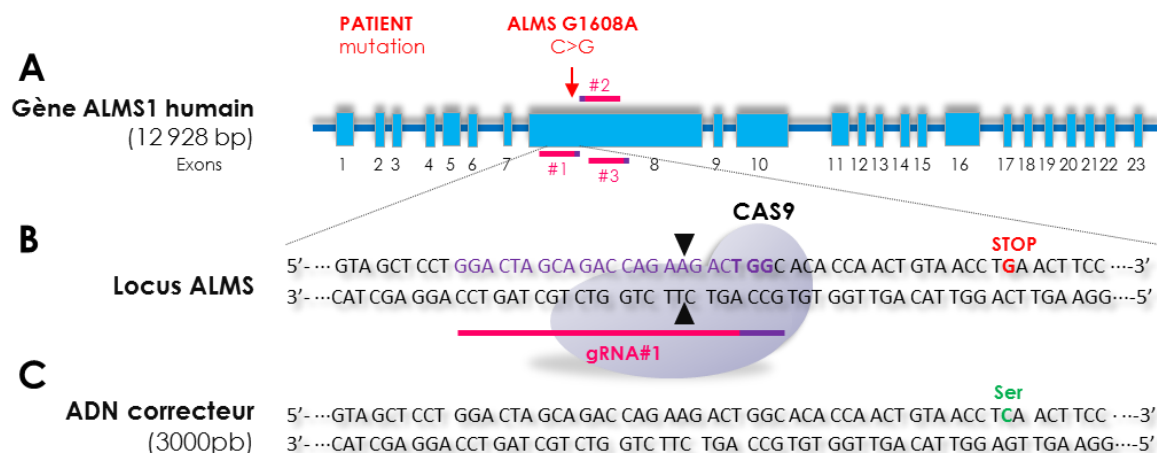


Figure 42: Construction des différents éléments du CRISPR/CAS9. A-B : Le gène ALMS1 et le locus ALMS muté sont représentés avec la mutation C>G qui engendre un codon STOP prématuré (TGA, en rouge). Les ARNg#1 à 3 sont schématisés (en rose et mauve) sur le gène ALMS1 en fonction de leur spécificité de liaison. La séquence des ARNg #1 est reprise en mauve ainsi que la séquence PAM qui permet la liaison de la CAS9. La coupure double brin de l'ADN génomique par le complexe CAS9/ARNg#1 se situe 3pb en amont de la séquence PAM (pointes de flèche noires). C : La séquence double brin correctrice comprend deux bras d'homologie de 1500pb de part et d'autre de la base à corriger (en vert).

Il a été montré que l'efficacité de coupure est liée à l'efficacité de liaison de l'ARNg à l'ADN génomique (Lin et al., 2014). Cette efficacité de liaison est basée sur l'homologie de séquence mais varie également en fonction du locus de l'ADN génomique. Nous avons donc dessiné 3 ARNg différents (#1 à #3 Figure 42, en rose) et testé leur fonctionnalité par le test T7 Endonucléase1 (T7E1) après transfection des différents plasmides dans des cellules HEK293T (Figure 43, A). La Cas9 seule, ou en présence des ARNg #2 et #3, est incapable de couper le locus muté du gène ALMS1 dans les cellules HEK293T (Figure 43, B). Nous avons calculé le pourcentage de coupure (%NHEJ) après migration des produits PCR, en rapportant la somme des intensités des 2 bandes d'ADN digéré sur la somme des intensités de toutes les bandes (d'ADN digéré et non digéré), comme décrit dans Grobarczyk et al., 2015. Seul le complexe Cas9/ARNg #1 (Figure 42, B, représenté en rose) coupe efficacement (~20%) et spécifiquement l'ADN

génomique 23 paires de bases en amont de la mutation ponctuelle (Figure 42, B, têtes de flèches noires).

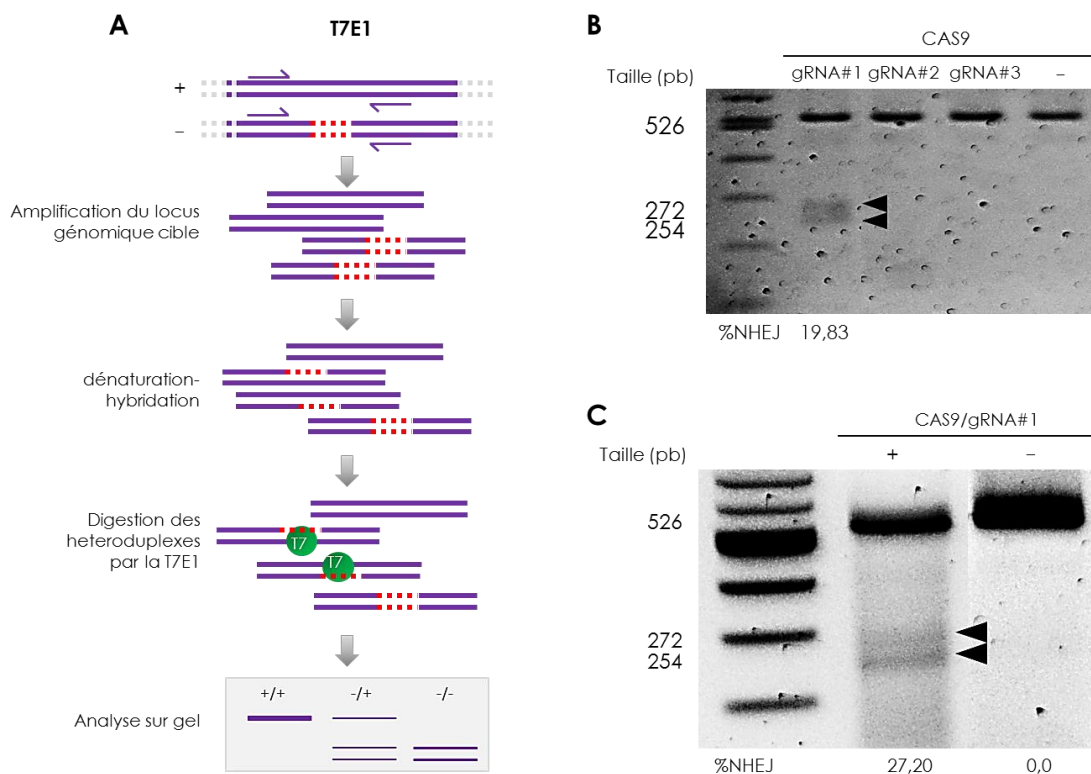


Figure 43: Test de la fonctionnalité du complexe CAS9/ARNg par digestion T7E1. A : Principe du test T7E1 : la coupure de l'ADN génomique par le complexe CAS9/ARNg conduit à la formation d'INDELS (pointillés rouges). Ces INDELS sont digérés par la T7E1, après amplification par PCR du locus génomique d'intérêt et une étape de dénaturation/hybridation qui génère des hétéroduplexes. L'ADN digéré est ensuite visualisé sur gel d'agarose : « +/+ » = pas de coupure par la T7E1 et donc pas de coupure du complexe CAS9/ARNg ; « -/+ » = un allèle est coupé et « -/- » = les 2 allèles sont coupés. B : T7E1 48h après transfection des plasmides CAS9 seule (« - » = contrôle négatif), ou CAS9 avec les ARNg #1, #2 ou #3, dans des HEK293T. La CAS9 seule ou en présence des ARNg #2 et #3 n'est pas capable de couper l'ADN génomique des HEK293T au niveau du locus ALMS. En présence de l'ARNg#1, la CAS9 coupe l'ADN génomique des HEK293T avec une efficacité de 19,8% (calculé d'après l'intensité des bandes comme décrit dans Grobarczyk et al., 2015). Pointes de flèches noires = ADN digéré par la T7E1. C : T7E1 48h après nucléofection des plasmides CAS9 seule (« - » = contrôle négatif), ou CAS9 avec l'ARNg#1 dans des hiPS ALMS. Les cellules hiPS transfectées sont sélectionnées pendant 24h avec du G418 avant l'extraction et la PCR génomique. La coupure du complexe CAS9/ARNg dans les hiPS mutées est visualisée après digestion par la T7E1. L'efficacité de coupure est estimée à 27,2% (comme décrit dans Grobarczyk et al., 2015). Pointes de flèches noires = ADN digéré par la T7E1.

Nous avons ensuite testé la fonctionnalité du complexe Cas9/ARNg#1 dans les cellules hiPS ALMS (Figure 43, C). Après transfection des vecteurs encodant pour la Cas9 et l'ARNg#1, suivi d'une sélection transitoire de 24h à la gentamycine, nous avons montré que la Cas9 seule ne coupe pas tandis que le complexe Cas9/ARNg#1 coupe au niveau du locus ALMS1 avec une efficacité de ~27% (Figure 43, C).

2.2 Correction de la mutation ponctuelle des cellules hiPS ALMS

La mutation C>G du gène ALMS1 est une mutation ponctuelle homozygote récessive. Nous postulons donc que la restauration d'un seul des deux allèles mutés suffira à restaurer l'expression de la protéine sauvage. Pour ce faire, les cellules hiPS ALMS sont transfectées avec 1) le plasmide d'expression de la Cas9 contenant la résistance à la gentamycine, 2) l'ARNg#1 et 3) le plasmide contenant la séquence correctrice ALMS1 WT de 3000pb (Figure 44). Deux jours plus tard, les cellules sont sélectionnées pendant 24h avec 100µg/ml de gentamycine. Les colonies apparaissent une dizaine de jours après la sélection et sont transférées dans une autre boîte de culture pour être amplifiées. Les colonies sont ensuite analysées par séquençage.

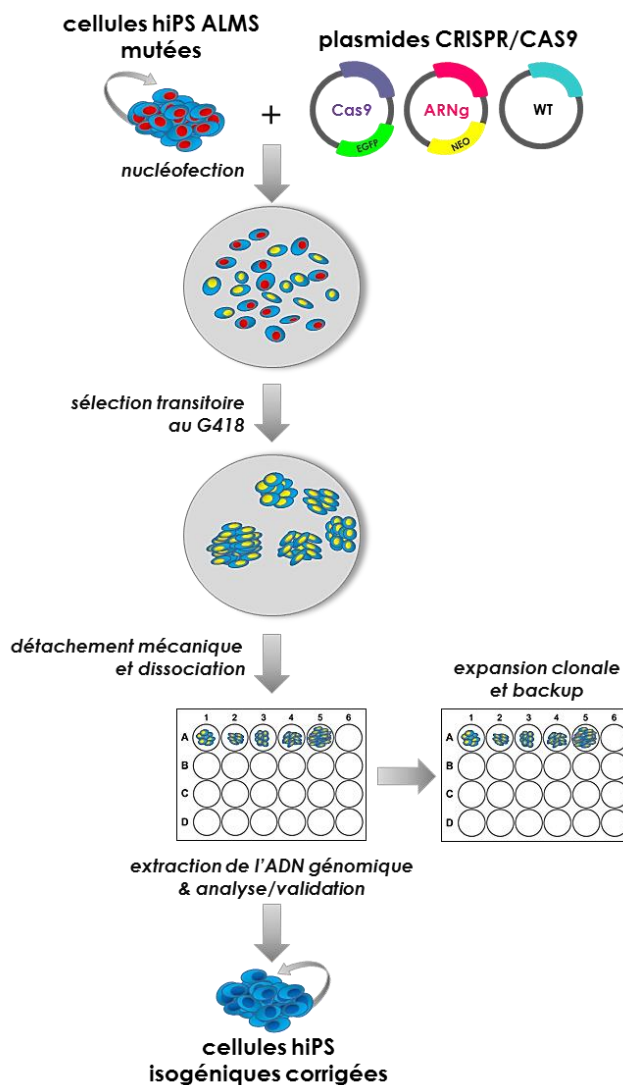


Figure 44: Résumé de la stratégie utilisée pour la correction de la mutation des hiPS ALMS par CRISPR/CAS9. Les cellules hiPS sont nucléofectées avec les 3 plasmides (« CAS9 » encodant pour la CAS9, « ARNg » encodant pour l'ARNg et « WT » contenant la séquence correctrice) et ensuite sélectionnées 2 jours plus tard, pendant 24h, avec 100mg/ml de G418. Les colonies résistantes apparaissent dans les 2 semaines qui suivent la nucléofection. Elles sont détachées une à une mécaniquement puis dissociées et transférées de manière clonale dans des puits séparés. Après expansion clonale et la constitution d'une plaque de sauvegarde, l'ADN génomique peut être extrait à partir de chaque clone et analysé par séquençage pour la correction du gène ALMS1.

Les évènements de recombinaison homologue et de correction de la mutation ponctuelle sont détectés par séquençage du locus génomique d'ALMS1. Au total, 148 clones hiPS ont été analysés par séquençage, 15 clones montrent des INDELS (INsertion/DELETions) (Figure 45) et 1 clone montre une correction au niveau d'un des deux allèles du gène ALMS1.

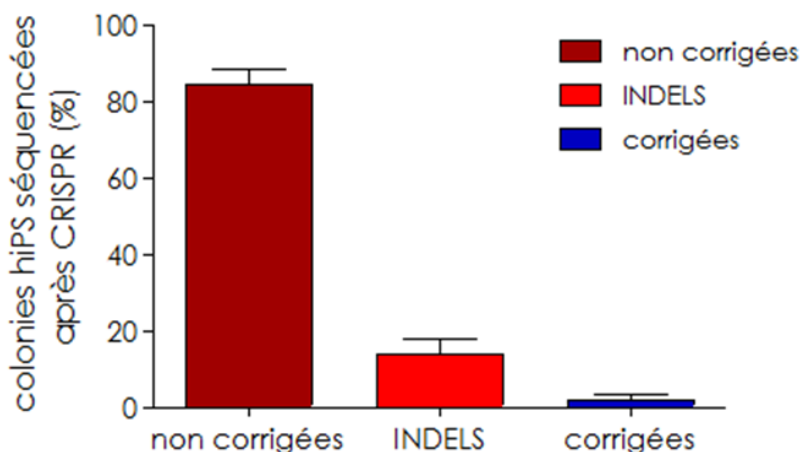


Figure 45: Efficacité de la correction du gène ALMS1 par CRISPR/CAS9 dans les hiPS mutées. Sur les 148 colonies séquencées provenant de 8 expériences indépendantes (n=8 nucléofections différentes), plus de 80% des colonies hiPS séquencées ne sont pas corrigées, 15% des colonies possèdent des INDELS et 2% des colonies (3) sont partiellement corrigées pour la mutation STOP du gène ALMS1. n=8 ; barres d'erreur = SEM.

L'analyse du chromatogramme après séquençage révèle la présence d'une guanine (G) et d'une cytosine (C) au niveau de la base mutée (Figure 46, C). Il y a donc une correction de la mutation sur un des deux allèles du gène ALMS1 (l'autre allèle restant muté).

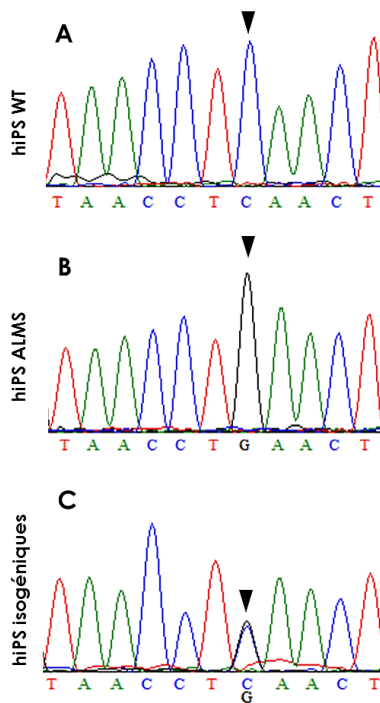


Figure 46: Analyse par séquençage des colonies hiPS isogéniques partiellement corrigées. A : Chromatogramme du locus génomique ALMS1 des cellules hiPS WT, B : hiPS ALMS et C : hiPS isogéniques partiellement corrigées. La correction partielle conduit à la génération de cellules hiPS isogéniques hétérozygotes pour la mutation. Les bases WT C, mutée G et partiellement corrigée C/G sont pointées par une pointe de flèche noire.

De manière très intéressante, nous avons observé par IF la réexpression de la protéine ALMS1 (en vert, Figure 47) au niveau du centrosome (maqué par la gamma-tubuline en rouge) des cellules hiPS isogéniques partiellement corrigées. Ces résultats suggèrent que la correction d'un seul des deux allèles mutés suffit à restaurer l'expression de la protéine ALMS1. Nous avons ensuite utilisé le CRISPR/CAS pour corriger avec succès l'allèle muté restant des cellules hiPS isogéniques partiellement corrigées (donnée non montrée).

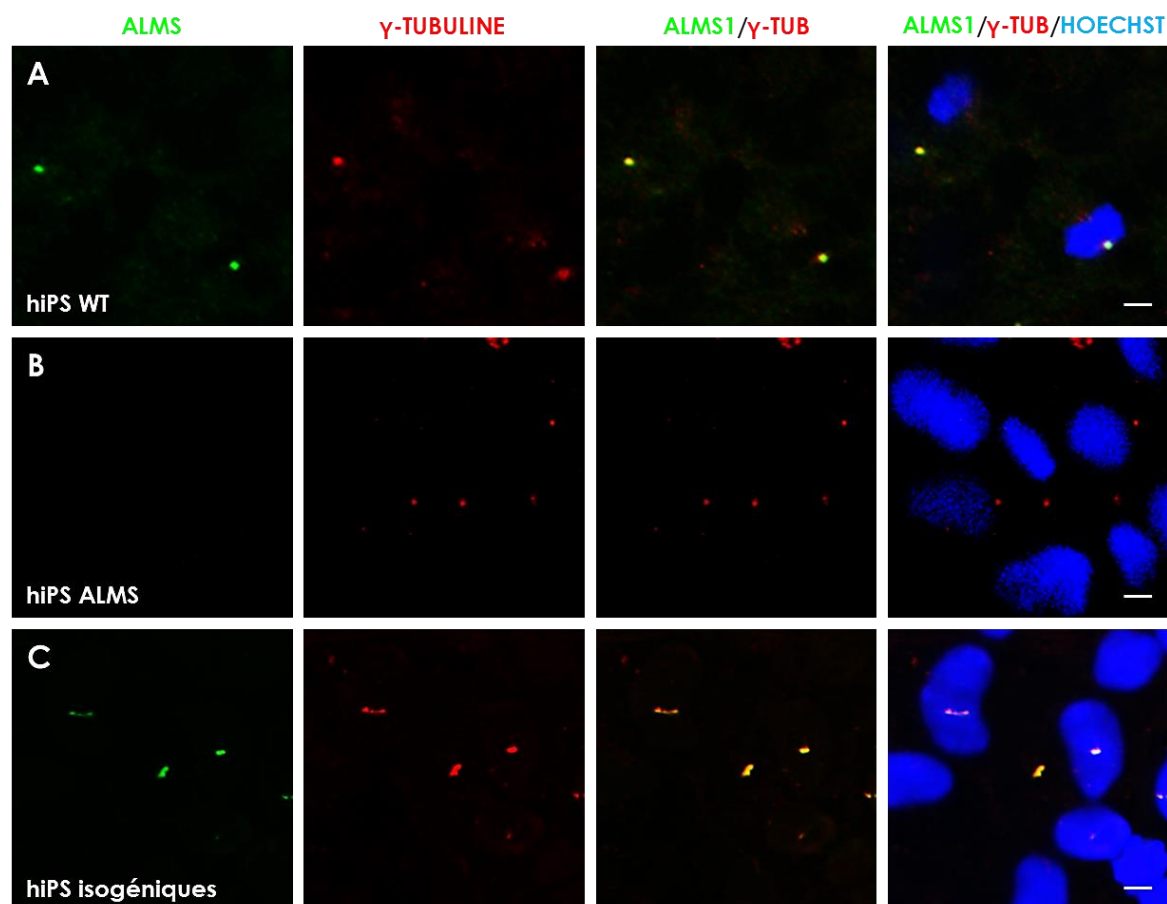


Figure 47: La correction partielle de la mutation restaure l'expression de la protéine ALMS1 dans les cellules hiPS isogéniques. A : ALMS1 (en vert) co-localise avec la gamma-TUBULINE (en rouge) au niveau du centrosome des cellules hiPS WT. B : La protéine ALMS1 n'est pas détectée dans les cellules hiPS ALMS. C : l'expression de la protéine ALMS1 (en vert) est restaurée au niveau du centrosome (en rouge) après correction partielle du gène ALMS1 dans les hiPS isogéniques. Barres d'échelle = 5 μ m.

Ces résultats montrent que l'application du CRISPR/Cas dans les hiPS mutées permet la correction précise et la restauration de l'expression de la protéine sauvage.

2.3 Validation des cellules hiPS isogénique corrigées

Nous avons ensuite vérifié les propriétés de pluripotence et d'auto-renouvellement des cellules hiPS isogéniques corrigées. Après leur expansion en culture, nous avons montré que tout comme leurs homologues mutées, elles expriment les protéines de pluripotence endogènes OCT4, NANOG, SOX2 et TRA1-81 (visualisées par immunomarquages, Figure 48, A-B) et les ARNm d'OCT4, NANOG et SOX2 (quantifiées par qRT-PCR, Figure 48, C).

Sur base de la séquence des 20 nucléotides qui composent l'ARNg et des 3 nucléotides du site de liaison PAM, nous avons ensuite recherché dans le génome, les séquences homologues à ces 23 nucléotides et potentiels « off targets » (OTs) (en utilisant BLAST et le programme développé par l'équipe du Dr. Zhang, disponible online : <http://crispr.mit.edu>). Parmi les 5 séquences génomiques des hiPS isogéniques qui partagent le plus d'homologie de séquence avec l'ARNg, aucune d'entre elle n'a montré de mutation (Figure 48, D). De plus, les colonies d'hiPS isogéniques ne possèdent pas d'insertion de séquence ADN étrangère provenant des plasmides transfectés, au niveau du gène ALMS1.

Nous avons finalement réalisé le caryotype des cellules hiPS isogéniques (Figure 48, E). Malheureusement, nous avons observé une anomalie chromosomique importante : la perte d'une partie du chromosome 7 (encadrement rouge). En parallèle, nous observons la même anomalie génomique dans des hiPS ALMS à passage correspondant et n'ayant pas été nucléofectées par les plasmides CRISPR. Nous attribuons donc cette instabilité aux nombreux passages de ces cellules et non à un effet secondaire de la nucléofection. De nouvelles expériences de correction du génome sont en cours à partir de cellules hiPS ALMS à bas passage et ayant un caryotype normal.

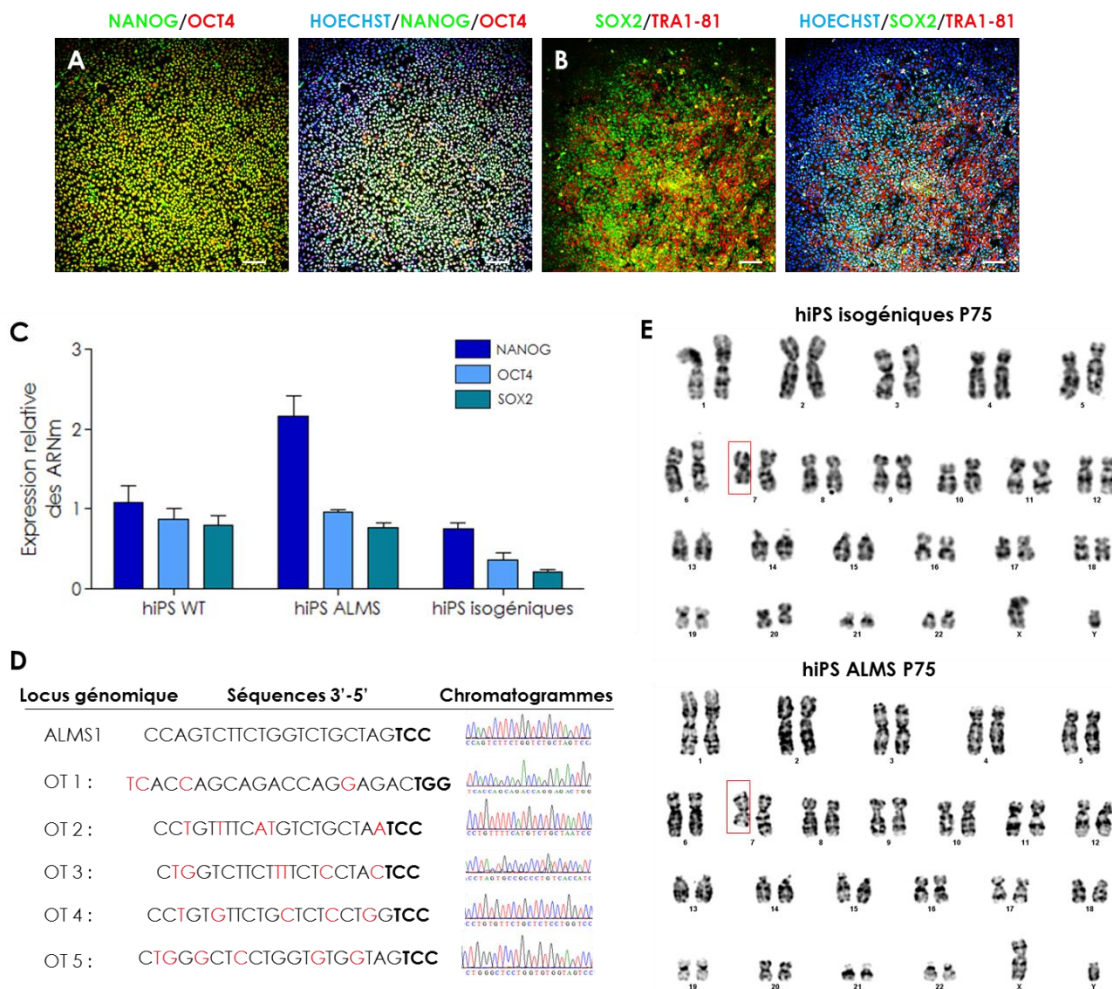


Figure 48: Validation de la pluripotence et de l'intégrité génomique des hiPS isogéniques. A-B : Les cellules hiPS isogéniques partiellement corrigées expriment les marqueurs de pluripotence NANOG, OCT4, SOX2 et TRA1-81 visualisés par IF. Barres d'échelle = 100µm. C : qRT-PCR des marqueurs de pluripotence NANOG, OCT4 et SOX2. Les amorces utilisées sont spécifiques des gènes endogènes (Fusaki et al., 2009). N=3 ; barres d'erreur = SEM. D : Analyse des OTs dans les hiPS isogéniques. Sur base de l'homologie de séquence, les 5 principaux sites génomiques d'OTs potentielles (OT 1 à 5) sont amplifiés par PCR et analysés par séquençage. Aucun ne contient de mutations. Le locus ALMS1 correspond à l'ADN génomique complémentaire à l'ARNg#1 et coupé par le complexe CAS9/ARNg#1. Dans les séquences génomiques 3'-5' : en gras, la séquence PAM et en rouge, les nucléotides qui diffèrent par rapport à la séquence du locus génomique d'ALMS1. E : Caryotype des hiPS isogéniques et ALMS à P75. On remarque une perte d'une partie du chromosome 7 (encadré rouge).

Ainsi, l'utilisation du CRISPR/Cas permet de corriger spécifiquement la mutation ponctuelle homozygote du gène ALMS1. Grâce à l'édition du génome, nous sommes capables de restaurer l'expression de la protéine dans les cellules hiPS sans intégration non contrôlée de séquences étrangères dans l'ADN génomique des cellules hiPS.

3. Différenciation des hiPSCs WT en cellules cochléaires

Nous nous sommes basés sur les principes du développement embryonnaire otique et sur les protocoles de différenciation des cellules souches embryonnaires murines et humaines en progéniteurs otiques puis en cellules ciliées déjà mis au point (Oshima et al., 2010; Chen et al., 2012; Koehler and Hashino, 2014 ; Ronaghi et al., 2014). Le jour du début du protocole est repris ci-après comme le jour 0 (J0). A chaque étape du protocole de différenciation, le phénotype des cellules est étudié par IF et qRT-PCR. Les mises au point ont été réalisées à partir d'hiPSCs WT déjà disponibles au laboratoire.

3.1 Induction de progéniteurs otiques

En bloquant les voies de signalisation WNT et TGF β (en ajoutant respectivement DKK1 et SB431542 au milieu de culture), nous favorisons l'induction d'ectoderme (Gadue et al., 2006). L'ajout d'IGF1 oriente la différenciation en ectoderme antérieur, plus sensible à l'induction otique (Pera et al., 2001). Cette première étape est réalisée sous forme de culture flottante (ou EBs). Après 6 jours de culture, les EBs sont mis à adhérer (boîtes de cultures préalablement traitées par de la poly-L-ornitine et de la laminine) en présence d'une concentration de FGF2 élevée (100ng/ml). Il a en effet été montré que le FGF2 est nécessaire et suffisant à l'induction des progéniteurs otiques (Freter et al., 2008; Chen et al., 2012). Le facteur de transcription PAX2 étant communément utilisé comme marqueur de progéniteurs otiques (Freter et al., 2008; Oshima et al., 2010; Chen et al., 2012), nous l'avons utilisé pour suivre la différenciation de nos cultures. Après l'induction ectodermique, au jour J6, nous n'avons détecté aucune cellule d'endoderme (SOX17+) ni de mésoderme (BRACHYURY+) par IF. Entre les jours J6 et J9, nous avons montré par IF, l'apparition des premières cellules PAX2 positives (Figure 49).

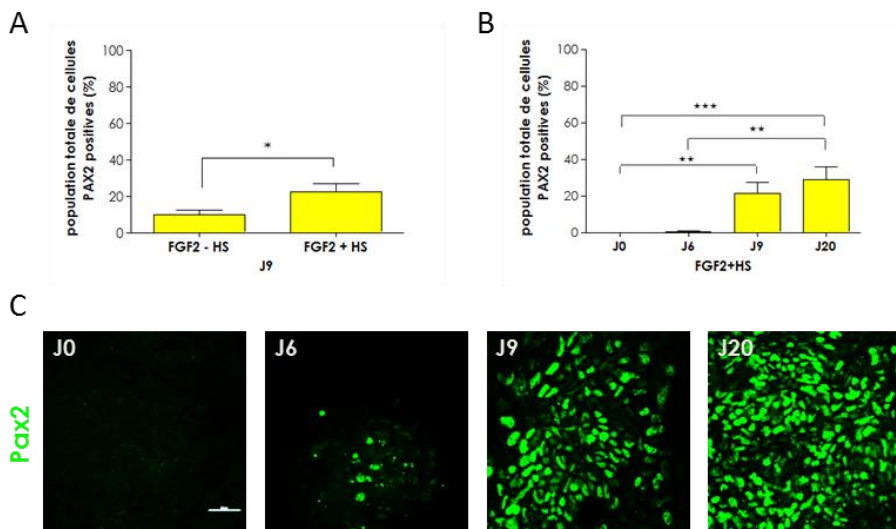


Figure 49: Les progéniteurs otiques PAX2 positifs sont induits de J9 à J20 en présence d’HS et de FGF2. A : Effet du sulfate d’héparine (HS) sur l’induction des progéniteurs otiques à J9 (3 jours de traitement). Le nombre de progéniteurs otiques PAX2 positifs induits passe de 10 à 20% de la population cellulaire totale lorsque l’HS est ajouté au milieu de culture. Analyse statistique : T test de Student, n=3, p=0,0244 ; barres d’erreur = SEM. B-C : En présence de FGF2 et d’HS, les progéniteurs otiques apparaissent entre J6 et J9 et le nombre de progéniteurs otiques PAX2 positifs augmentent graduellement de J6 à J20. Analyse statistique : 1 way ANOVA, n=3, p<0,05 ; barres d’erreur = SEM. C : barres d’échelle = 50µm.

Nous avons ensuite testé l’effet du sulfate d’héparane (HS) qui a pour propriété de stabiliser la liaison du FGF2 avec son récepteur (Schlessinger et al., 2000). Nous avons observé qu’en présence d’HS (50ng/ml), le nombre de cellules PAX2 positives augmente significativement en passant de $9,6\pm 2,6$ à $22,14\pm 4,6\%$ au jour J9 (Figure 49, A). Et si l’induction otique est prolongée et les cellules traitées avec du FGF2 et de l’HS jusqu’au jour J20, le nombre de progéniteurs otiques qui expriment PAX2 augmente jusque $28,9\pm 6,9\%$ du total des cellules (Figure 49, B-C). Pour cette raison, l’HS est ajouté systématiquement au milieu de culture.

Nous avons ensuite vérifié la présence d’autres protéines spécifiques d’un destin otique. A partir de J9 et jusqu’à J20, nous avons montré par IF, que les cellules PAX2 positives co-expriment les marqueurs caractéristiques et spécifiques des progéniteurs otiques PAX8, SIX1 et SOX2 (Figure 50, A-F). De manière importante, ces cellules otiques qui expriment PAX2 n’expriment pas PAX6, un marqueur de neurectoderme (Chambers et al., 2009) et de destin optique (Lamba et al., 2006) (Figure 50, D’ et F). A J9, $15,2\pm 4,4\%$ des cellules en culture co-expriment PAX2/PAX8 et $20,2\pm 3\%$, PAX2/SIX1 (Figure 50, G). A J20, entre $30,9\pm 2,6$ et $25,8\pm 8,6\%$ des cellules totales en culture présentent un patron d’expression génique et protéique correspondant aux progéniteurs otiques (Figure 50, G).

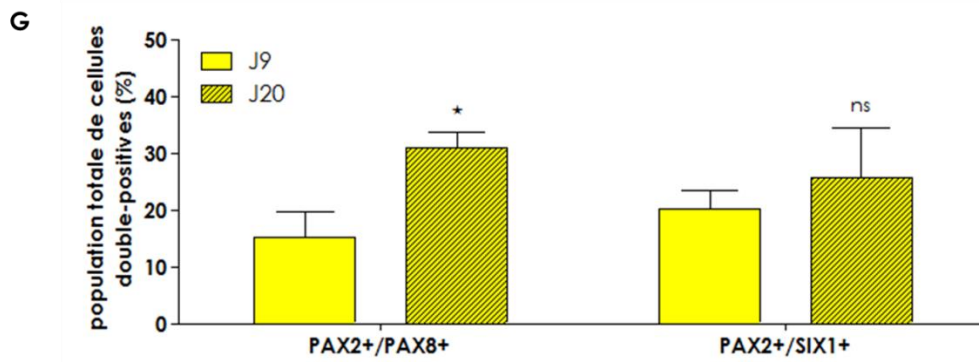
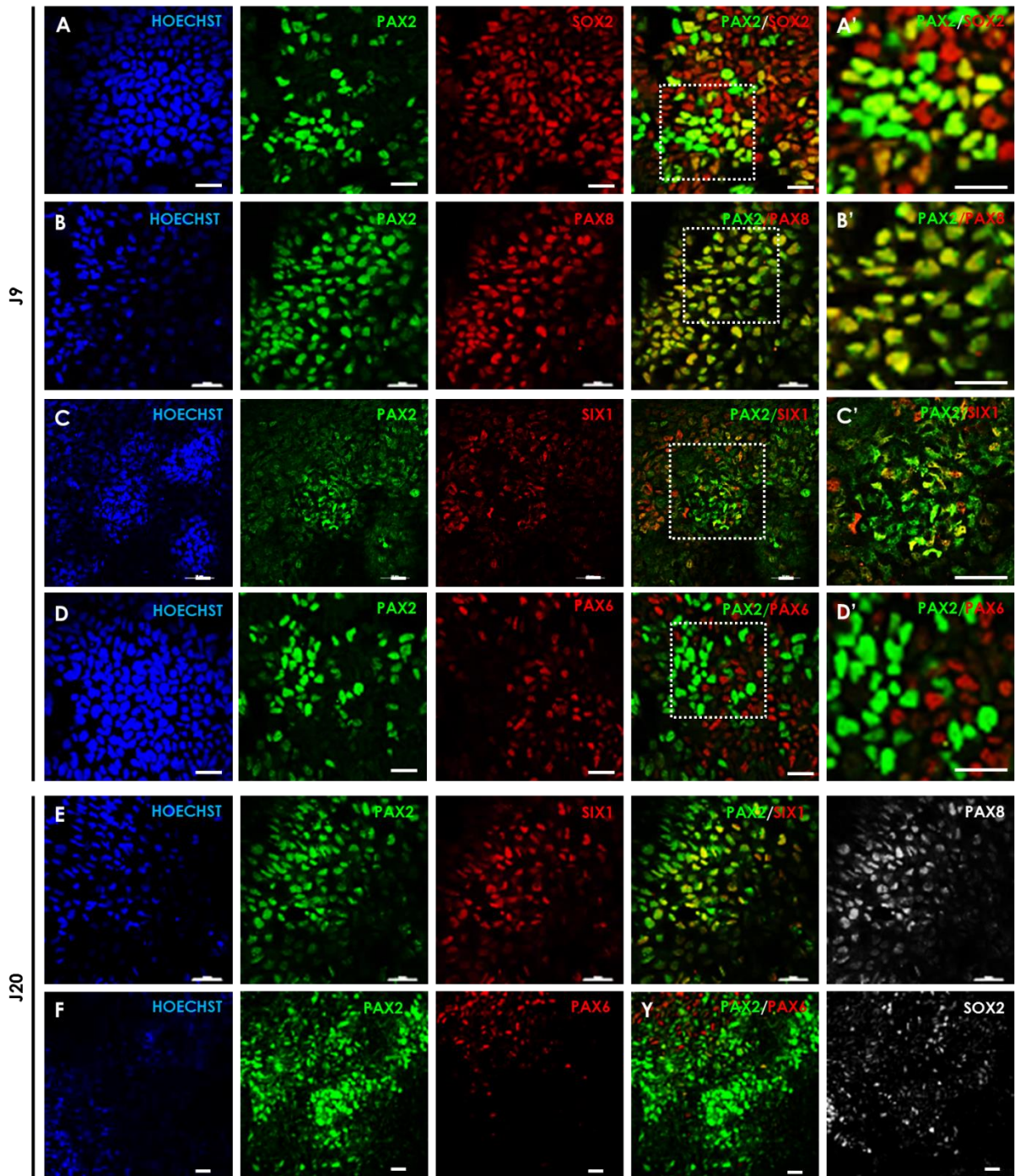


Figure 50: Caractérisation des progéniteurs otiques WT à J9 (A-D) et J20 (E-F). A J9, les progéniteurs otiques PAX2 positifs (en vert) co-expriment les marqueurs de progéniteurs otiques SOX2, PAX8 et SIX1 (A-C ; en rouge). Par contre, les progéniteurs otiques PAX2 positifs n'expriment pas PAX6, un marqueur de progéniteurs neuroectodermique et optique (D, D' ; en rouge). A' - D' = zoom sur les cadres pointillés respectifs de A-D. A J20, les progéniteurs otiques co-expriment PAX2, SIX1, PAX8 et SOX2 mais pas PAX6 (E, F). Barres d'échelle = 10µm. G : Quantification du nombre total de cellules à J9 et J20, co-exprimant PAX2 et PAX8 et, PAX2 et SIX1. Analyse statistique : T test, n=3, PAX2/PAX8 : p=0.0127 ; PAX2/SIX1 : p=0.4685 ; barres d'erreur = SEM.

Par qRT-PCR à différents stade de l'induction otique (J9, J15 et J20) nous avons confirmé les résultats obtenus par IF. En présence de FGF2 et d'HS, l'expression des marqueurs PAX2, PAX8 et SIX1 augmentent alors que l'expression de PAX6 reste faible. De plus, nous avons montré que le FGF2 était nécessaire à l'induction des progéniteurs otiques, par l'ajout de SU4802 (10µM), un inhibiteur de la voie de signalisation FGF. L'ajout du SU5402 permet également l'inhibition du FGF2 qui est sécrété par les cellules en culture. En effet, en présence du SU5402, les facteurs de transcription otiques ne sont pas exprimés mais bien les cellules PAX6 neuroectodermales (Figure 51).

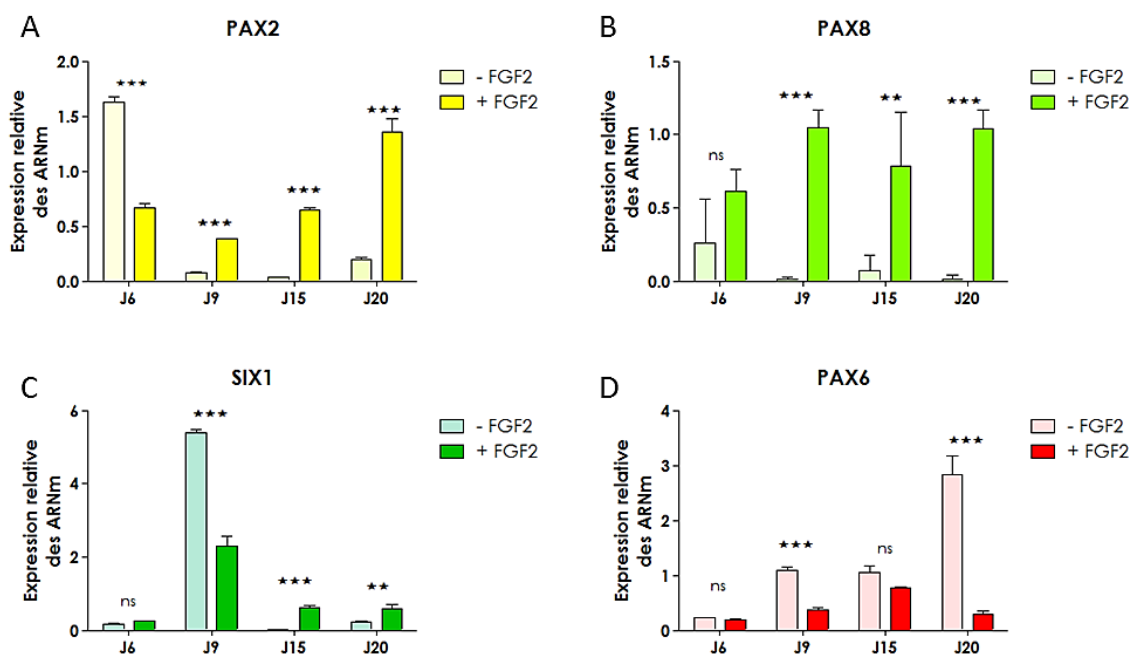


Figure 51: Le FGF2 induit spécifiquement les progéniteurs otiques. qRT-PCR à différent stade de l'induction otique (J6, J9, J15 et J20) montrant l'expression relative des ARNm de PAX2 (A), PAX8 (B), SIX1 (C) et PAX6 (D) en présence de FGF2 (« + FGF2 » couleurs) et en présence de SU5402, un inhibiteur de FGF2 (« - FGF2 » couleurs pâles). Les résultats ont été normalisés sur l'expression de GAPDH. En absence de FGF2, les cellules n'expriment pas les marqueurs de progéniteurs otiques PAX2, PAX8 et SIX1 (A-C) mais le marqueur de neuroectoderme PAX6 (D). Inversement, en présence de FGF2, les marqueurs otiques sont exprimés et la génération des cellules neuroectodermiques est réduite. Analyse statistique : 1 way ANOVA, n=3, « ns » = p>0,05 ; « ** » = p<0,01 ; « *** » = p<0,001 ; barres d'erreur = SEM.

Afin d'obtenir une population homogène de progéniteurs otiques, nous avons passé les cellules à J14 après l'induction otique et les avons transférées en condition adhérente sur gélatine, dans du milieu DFNB en présence de FGF2, EGF et IGF1. Il a été montré la combinaison de ces 3 facteurs permettait la prolifération *in vitro* des cellules progénitrices otiques (Chen et al., 2012). Le passage des cellules après induction otique à J20 (Figure 52), nous permet de sélectionner (et d'enrichir) les cellules progénitrices en prolifération au détriment des cellules déjà différenciées non proliférantes (qui mourront). Les cellules en culture à ce stade sont des progéniteurs otiques (hOSCs pour « human Otic Stem Cells ») qui peuvent être maintenus en culture ou congelés afin de créer un stock de hOSCs (qui pourront être décongelés pour être différenciés). Quelques jours après le passage à J20, nous observons une augmentation significative jusqu'à $76,31 \pm 8,5\%$ et $80,38 \pm 8,4\%$ des cellules qui co-expriment les marqueurs de progéniteurs otiques PAX2/PAX8 et PAX2/SIX1 (Figure 52, A, B et E). Les hOSCs générées expriment également la cadhérine E (ECAD), SOX2, SOX9 et le marqueur de prolifération Ki67 par IF (Figure 52, C-D). Après plusieurs passages ou une décongélation, les cellules continuent d'exprimer les marqueurs de progéniteurs otiques (Figure 52, C-D). Nous avons confirmé ces résultats par qRT-PCR à différents stades du protocole (Figure 52, F : J0 ou hiPS, J20 avant le passage et hOSCs après le passage). Les marqueurs de pluripotence, tels que NANOG et OCT4, sont exprimés par les cellules hiPS WT et ne sont plus exprimés pendant la différenciation (en bleu). Le passage en condition « hOSCs » à J20 conduit à une surexpression des marqueurs otiques tels que SOX2, PAX2, PAX8 et SIX1 (en jaune et vert) et une diminution de l'expression des marqueurs neurectodermiques (en rouge) qui sont exprimés à J20 avant le passage et presque totalement éteints après le passage en condition « hOSCs ». En effet, parmi les hOSCs nous n'observons quasi plus de cellules neurectodermiques PAX6 et SOX1 positives en IF (Figure 52, B-D).

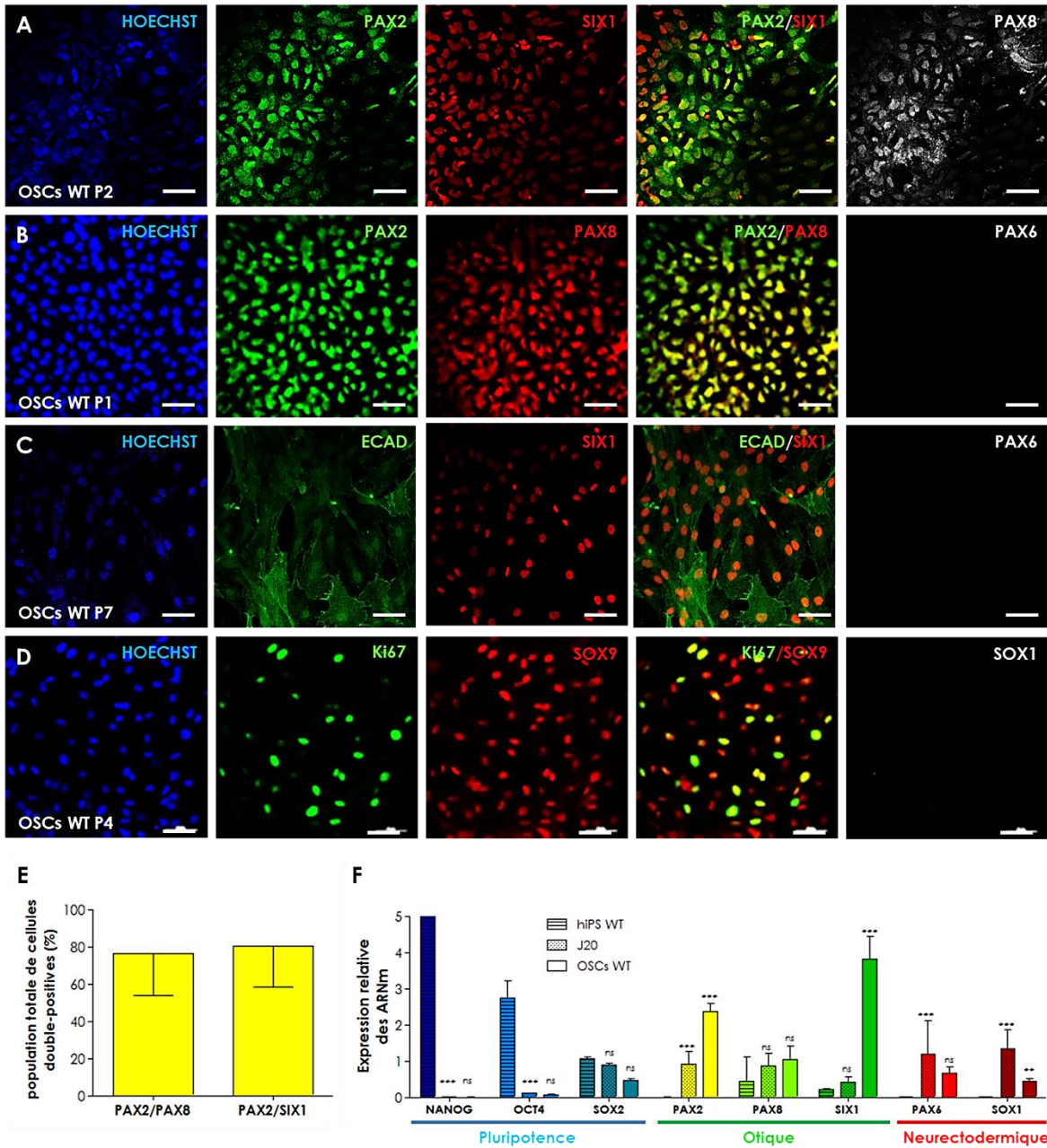


Figure 52: Obtention d'une population homogène d'hOSCs après le passage en condition « hOSCs » à J20. A-C : Quelques jours après le passage à J20 (P1, A) et après plusieurs passages (P4, B-C), les hOSCs continuent d'exprimer les marqueurs otiques PAX2, PAX8, SIX1 et SOX9. Après plusieurs passages, les hOSCs WT, positives pour Ki67, continuent de proliférer (C, en vert). Très peu de cellules neurectodermiques PAX6 (A-B, en blanc) et SOX1 (C, en blanc) sont observées. Barres d'échelle = 10µm. D : Quantification du nombre total de cellules co-exprimant PAX2 et PAX8 et, PAX2 et SIX1, après le passage en condition « hOSC ». Analyse statistique : T test, n=3, p=0,7491 ; barres d'erreur = SEM. E : qRT-PCR à différents stades du protocole de différenciation (J0 ou hiPS, J20 avant le passage et hOSCs après le passage). L'expression des marqueurs de pluripotence (en bleu) est directement diminuée. SOX2 est un gène de pluripotence qui continue d'être exprimé dans les cellules progénitrices. L'expression des marqueurs otiques (en jaune et vert) augmente graduellement au cours du protocole. Les marqueurs neurectodermiques PAX6 et SOX1 (en rouge) sont exprimés à J20 avant le passage mais leur expression est diminuée après le passage en condition « hOSCs ». Analyse statistique : 2 way ANOVA, n=3, « ns » = p>0,05 ; « ** » = p<0,01 ; « *** » = p<0,001 ; barres d'erreur = SEM.

Les cellules neurectodermiques sont induites *in vitro* par défaut à partir des cellules hES (revu dans Munoz-Sanjuan and Brivanlou, 2002). Lors du développement embryonnaire normal, l'induction neurale représente en effet la première étape de la formation des dérivés ectodermiques (dont font partie les progéniteurs de la vésicule otique). Nous avons donc caractérisé plus en détails le profil d'expression génique des hOSCs WT par comparaison à des hNSCs (pour « human Neural Stem Cells ») WT (Figure 53). Les hNSCs sont des cellules progénitrices neurectodermiques qui sont différenciées *in vitro* à partir de cellules hES selon un protocole de différenciation mis au point au laboratoire (Données non publiées). Par RT-PCR quantitative, nous observons que les hOSCs, contrairement aux hNSCs, expriment les marqueurs otiques (en vert et jaune) et expriment des niveaux très faibles de marqueurs neurectodermiques (en rouge).

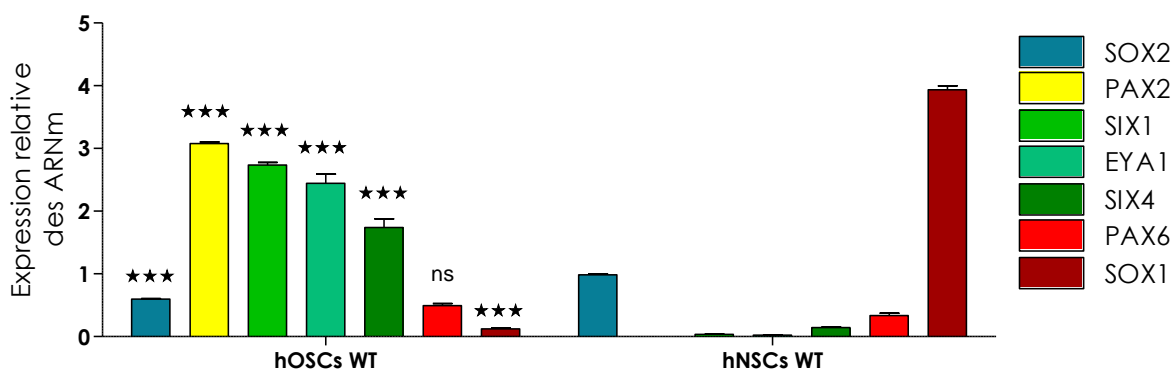


Figure 53: Comparaison du profil d'expression des hOSCs et des hNSCs. Les gènes du destin otique sont représentés en jaune et nuance de vert, et les gènes du destin neurectodermique sont représentés en rouge. Analyse statistique: 2 way ANOVA, n=3, « ns » = p>0,05 ; « *** » = p<0,001 ; barres d'erreur = SEM.

3.2 Différenciation terminale en cellules cochléaires

Afin de convertir les hOSCs en cellules cochléaires, nous les mettons en culture sur un tapis de cellules otiques et mésenchymateuses, dissociées à partir d'embryons de souris de 14 jours (E14) qui semble favoriser la différenciation en cellules ciliées (Doetzlhofer et al., 2006; Doetzlhofer et al., 2004; Oshima et al., 2010) (Figure 54).

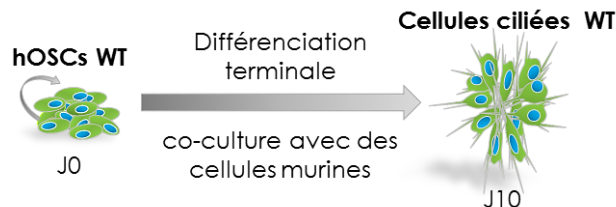


Figure 54: Stratégie utilisée pour la différenciation terminale des hOSCs WT en cellules ciliées WT.

Les cellules nourricières murines, sont capables de se différencier *in vitro* en cellules ciliées en présence d'EGF (Bianchi et al., 2002; Doetzlhofer et al., 2004). Pour éviter la formation de cellule ciliée à partir de ces cellules nourricières murines, ces dernières sont dissociées et mises en culture à faible densité (10 000 cellules/cm²). En effet, lorsque les cellules dissociées sont ensemencées à moins de 500 000 cellules/cm², aucune cellule ciliée murine n'est observée (Bianchi et al., 2002).

Après 10 jours de co-culture, nous observons par IF des cellules humaines doublement positives pour ATOH1 et MYOSINE6, deux marqueurs spécifiques des cellules ciliées (Figure 55). En utilisant un anticorps marquant spécifiquement les noyaux humains (NOYAUX HUM, en blanc) nous pouvons confirmer que ce sont les cellules humaines et non nourricières murines qui se sont différenciées. Ces cellules ciliées sont organisées en rosettes entourées de cellules murines co-exprimant SOX9 et SOX2, deux marqueurs progéniteurs otiques qui restent exprimés dans les cellules de soutien différenciées. Nous n'avons pas observé la formation de cellules de soutien humaines (par IF cellules coexprimant le marqueur de noyaux humains et les marqueurs de cellules de soutien PROX1, p27^{cip1}, HES1 ou NOTCH1) et l'efficacité de génération des cellules ciliées WT est relativement faible.

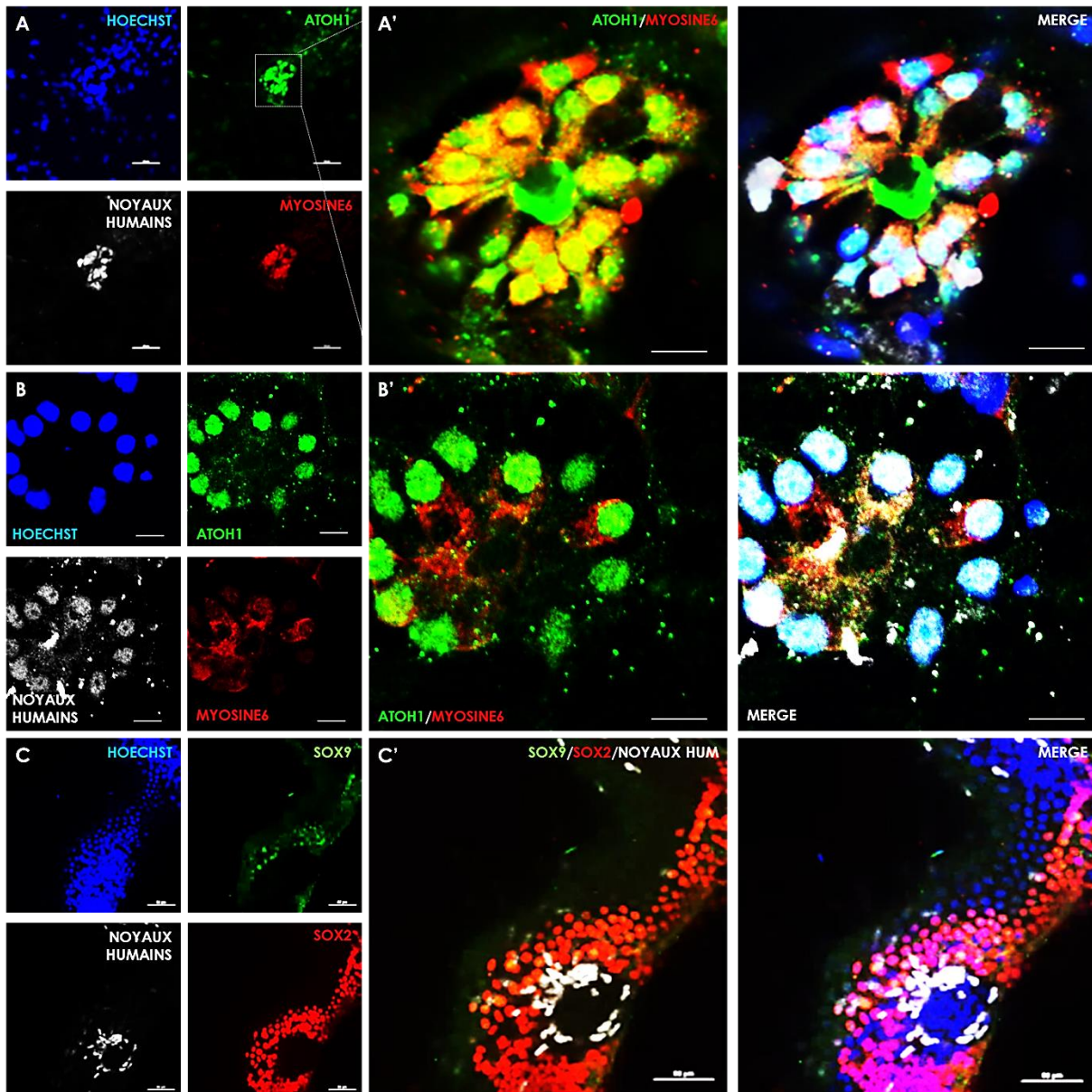


Figure 55: Les hOSCs WT sont capables de se différencier, après 10 jours de co-culture *in vitro*, en cellules ayant un profil d'expression caractéristiques de cellules ciliées. A-B : Les cellules ciliées différenciées co-expriment les marqueurs de différenciation terminale en cellules ciliées, ATOH1 (en rouge) et MYOSINE6 (en vert) et dérivent de cellules humaines marquées par un marqueur de noyaux humains (en blanc). C : Les cellules humaines (en blanc) sont organisées en rosette, entourées de cellules murines co-exprimant les marqueurs caractéristiques de cellules de soutien, SOX9 (en vert) et SOX2 (en rouge). Barres d'échelle = 50µm.

Nous avons ensuite testé la fonctionnalité des cellules ciliées néoformées obtenues en les incubant avec du FM1-43, une molécule fluorescente ayant la propriété de pénétrer les cellules spécifiquement par leurs canaux mécano-sensibles qui ne sont présents que dans des cellules ciliées (Gale et al., 2001). De manière intéressante nous avons observés des cellules humaines organisées en rosette caractéristique ayant incorporé le FM1-43 (Figure 56).

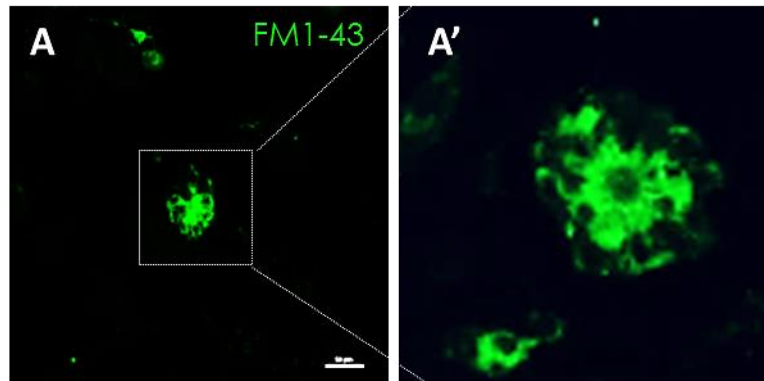


Figure 56: Le fluorochrome FM1-43, visualisé en temps réel (A), rentre spécifiquement dans les cellules ciliées différenciées par les canaux mécano-sensibles normalement présents à leur surface apicale. A'=zoom. Barre d'échelle = 10µm.

4. Modélisation et étude de la pathologie humaine

Pour élucider les mécanismes qui sous-tendent la surdité des patients atteints du syndrome d'Alström, nous avons tout d'abord étudié les capacités de différenciation des cellules hiPS ALMS en cellules cochléaires mutées. Ensuite, nous nous sommes focalisés sur l'étude de la prolifération et de la ciliogenèse aux différents stades développementaux (Figure 57 : hiPS, hOSCs et cellules ciliées) du modèle pathologique humain développé.

Pour toutes ces expériences, des cellules hiPS WT dérivées d'un donneur sain ont été utilisées comme lignée contrôle.

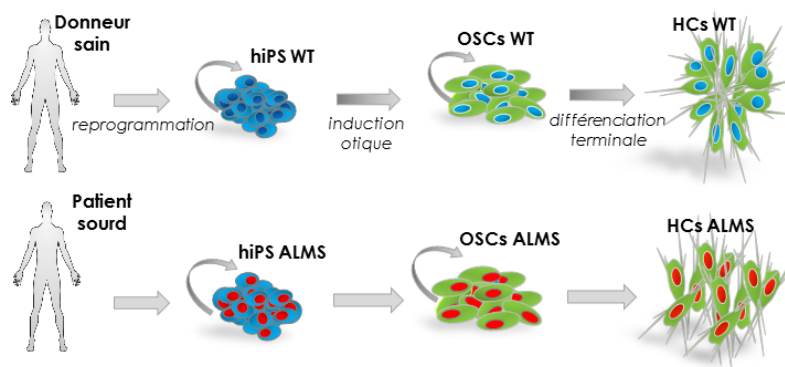


Figure 57: Différents stades de différenciation étudiés : J0 ou hiPS, progéniteurs otiques ou hOSCs et cellules ciliées différenciées après 10 jours de co-culture. Une lignée WT (à état de différenciation correspondant) provenant d'un donneur sain est utilisée comme contrôle pour toutes les expériences qui suivent.

4.1 Etude des capacités de différenciation des cellules hiPS mutées en cellules cochléaires

L'origine de la surdité des patients atteints du Syndrome d'Alström est encore inconnue. Dans un premier temps, nous avons donc étudié la capacité de différenciation des cellules hiPS en hOSCs. Pour ce faire, nous avons différencié les hiPSCs ALMS mutées en progéniteurs otiques avec succès selon le protocole mis au point à partir des cellules hiPS WT. Les hiPSCs ALMS sont capables de se différencier en progéniteurs otiques ALMS co-exprimant PAX2, PAX8 et SIX1 à partir de J9. Nous avons confirmés ces résultats par IF (Figure 58, A-D) et qRT-PCR (Figure 58, E-F) à différents jours de l'induction otique (J9, J15 et J20). A ces stades de différenciation et après quantifications nous n'avons observé aucune différence par rapport à l'induction des progéniteurs otiques WT.

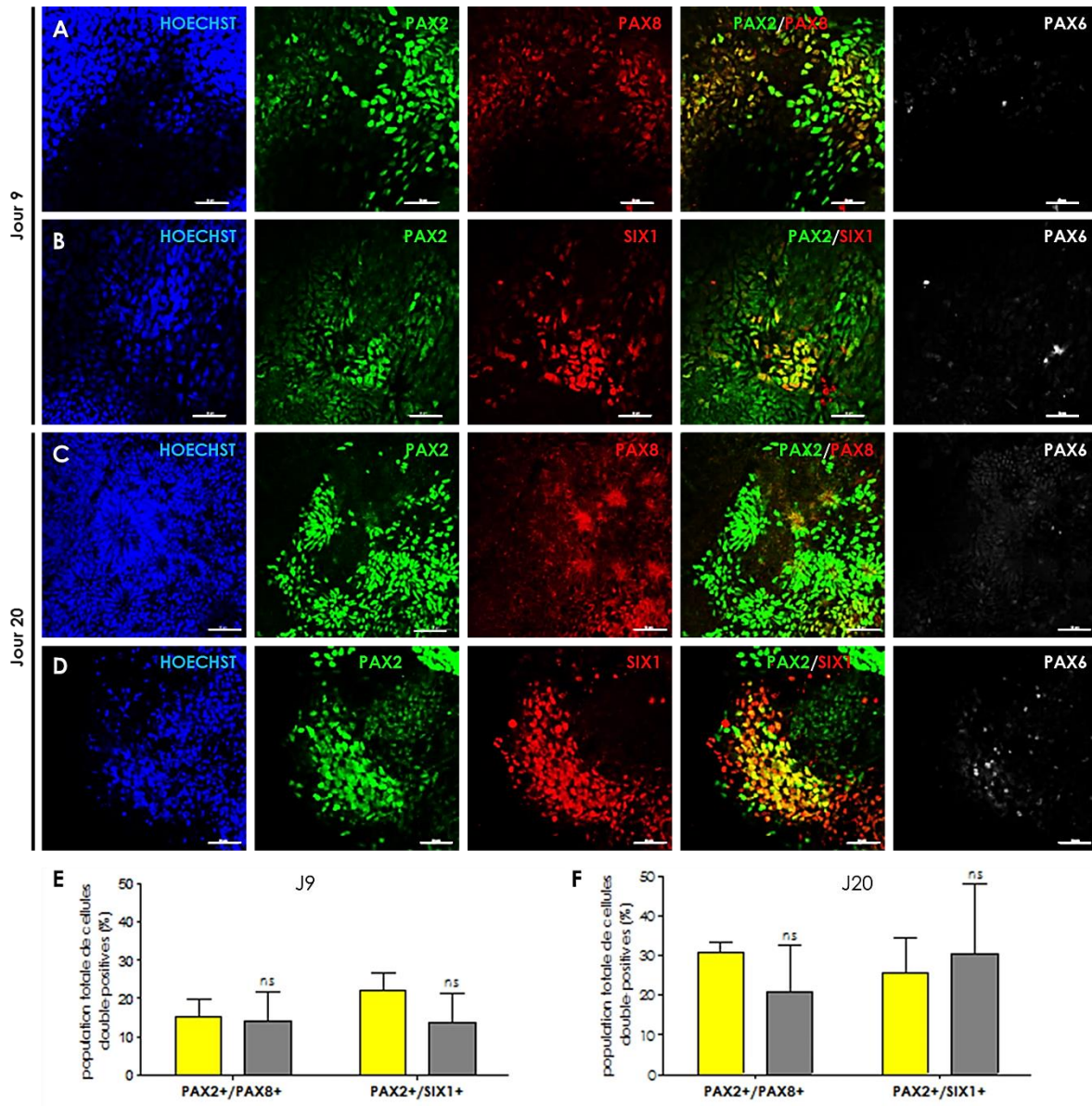


Figure 58: Induction des progéniteurs otiques ALMS à partir des cellules hiPS ALMS. A-B : A J9, les progéniteurs otiques induits co-expriment les marqueurs de progéniteurs otiques PAX2 (en vert), PAX8 et SIX1 (en rouge). Peu de cellules neurctodermiques PAX6 positives ont été observées (en blanc). C-D : A J20, avant le passage en condition « hOSCs », les cellules en culture continuent d’exprimer les marqueurs de progéniteurs otiques. Barres d’échelle = 10µm. E-F : Quantification du nombre de progéniteurs otiques ALMS (en rouge) co-exprimant PAX2 et PAX8 et, PAX2 et SIX1 à J9 (E) et J20 (F). Ces quantifications sont comparées avec celles obtenues à partir des hiPS WT à J9 et J20 (en bleu), comme contrôle et aucune différence significative n’est observée. Analyse statistique : 2 way ANOVA, n=3, « ns » = p>0,05 ; barres d’erreur = SEM.

Après le passage en conditions « hOSCs » à J20, les hOSCs ALMS co-expriment PAX2/PAX8 et, PAX2/SIX1 visualisés par IF (Figure 59). Après quantification, nous n’observons pas de différences significatives en comparaison aux hOSCs WT. Les hOSCs ALMS co-expriment également ECAD, SOX9 et Ki67.

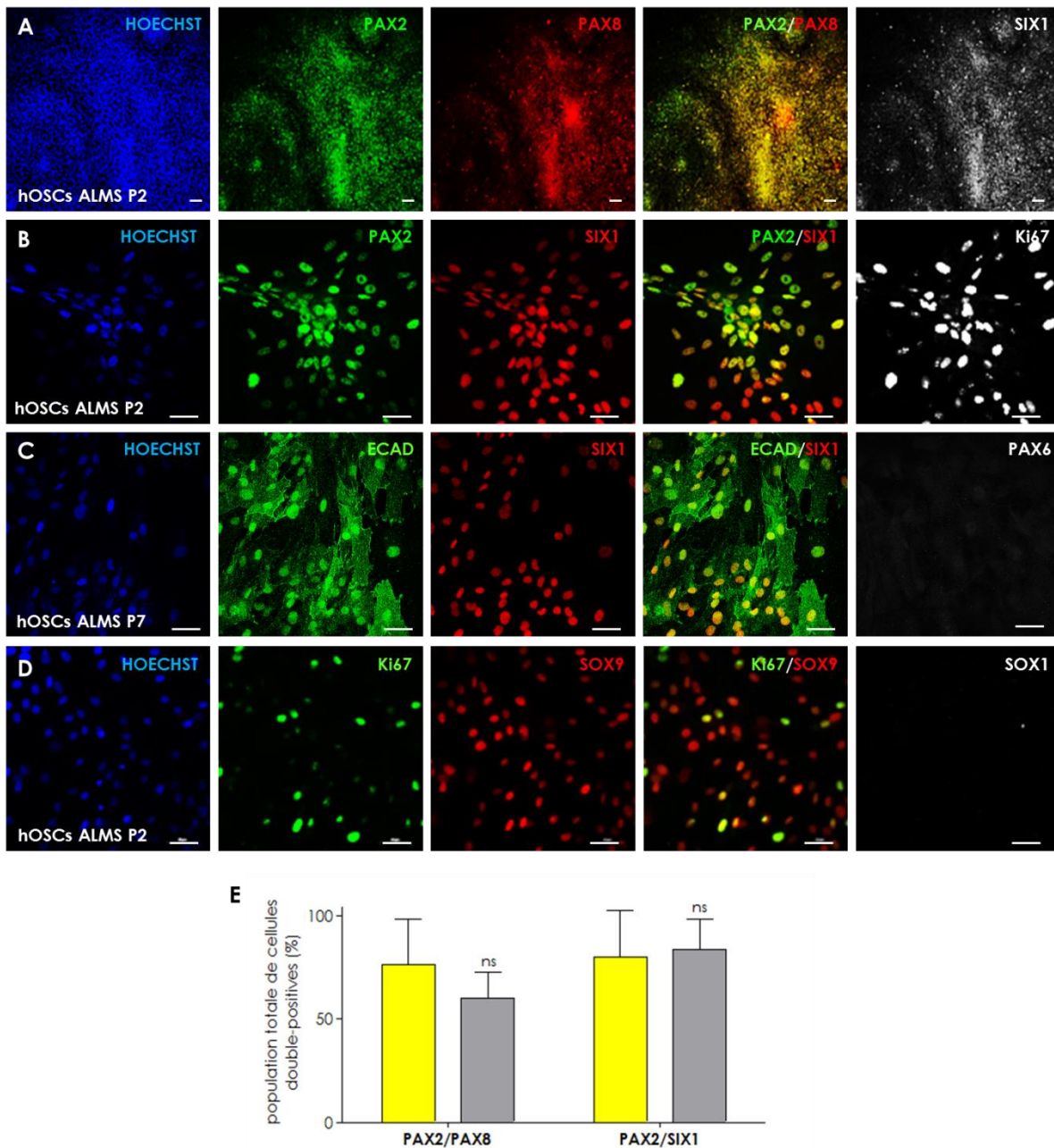


Figure 59: Génération des hOSCs ALMS. A-D : Les cellules hOSCs ALMS co-expriment les marqueurs otiques. Barres d'échelle = 10µm. E : Quantification des cellules hOSCs WT (jaune) et ALMS (gris) double positives pour PAX2/PAX8 et PAX2/SIX1. Aucune différence significative n'est observée en comparaison aux hOSCs WT. Analyse statistique : 2 way ANOVA, n=3, « ns » = p>0,05 ; barres d'erreur = SEM.

Nous avons ensuite étudié la capacité des hOSCs mutées à se différencier en cellules ciliées. La différenciation terminale des hOSCs ALMS en cellules cochléaires est réalisée de la même manière que pour les cellules saines, en co-culture avec des cellules nourricières d'embryon de souris (E14). Après 10 jours de co-culture nous avons observé par IF des groupes de cellules

humaines double-positives pour ATOH1 et MYOSINE6 (Figure 60). Nous n'avons pas observé la formation de rosette cochléaire.

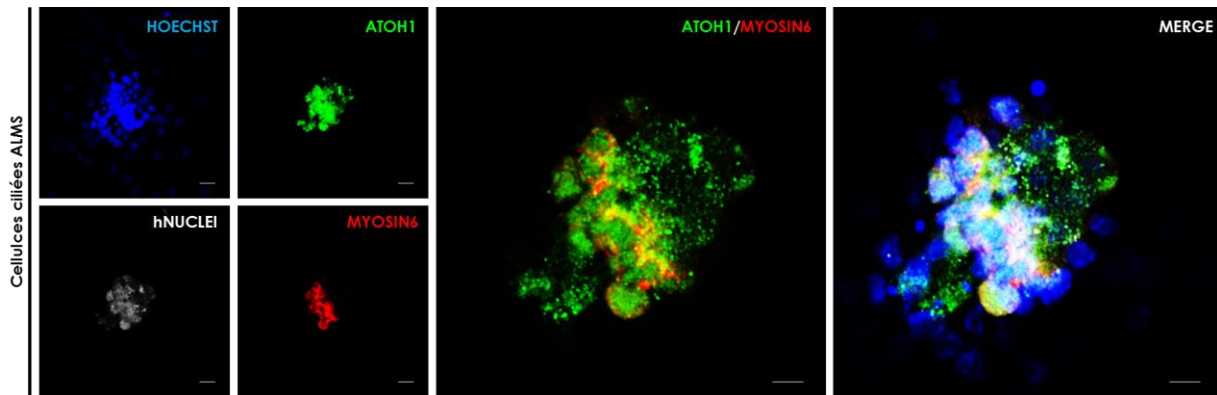


Figure 60 : Différenciation terminale des hOSCs ALMS en cellules ciliées pathologiques après 10 jours de co-culture. Barre d'échelle = 10 μ m

Ces résultats confirment que la capacité de différenciation des cellules hiPS ALMS en cellules ciliées mutées ne semble pas affectée chez les patients atteints du syndrome d'Alström comme suggéré par Jagger *et al.* après l'étude de la souris KO-ALMS1 (Jagger et al., 2011). Cependant, leur organisation en rosette semble perturbée et la génération des cellules ciliées mutées est très peu efficace, rendant très difficile l'étude du modèle à ce stade de différenciation.

4.2 Etude de la prolifération aux différents stades de différenciation

De manière générale, il a été montré que des cellules portant une mutation pour ALMS1 semblent moins proliférer en comparaison à des cellules saines, à partir du moment où elles sont en prolifération et donc non différenciées (Zulato et al., 2011). Il a par exemple été montré que les fibroblastes mutés avaient un taux de prolifération cellulaire plus lent par rapport aux fibroblastes contrôles suggérant un rôle d'ALMS1 dans la division cellulaire (Zulato et al., 2011). Inversement, les cellules totalement différenciées portant une mutation pour ALMS1 semblent ré-entrer en cycle cellulaire et proliférer de manière anormale (Shenje et al., 2014; Li et al., 2007).

Par exemple, une hypertrophie tissulaire cardiaque et rénale est observée chez les patients ALMS (Shenje et al., 2014; Li et al., 2007).

Nous avons donc étudié la prolifération (par immunomarquage avec Ki67, une protéine régulatrice du cycle cellulaire qui est exprimée dans les cellules en prolifération (Booth et al., 2014), la mitose (par immunomarquage avec pHH3, une protéine mitotique) et la réplication de l'ADN (par incorporation de BrdU, un analogue de thymidine) des cellules hiPS ALMS. Par comparaison avec une lignée hiPS WT déjà disponible au laboratoire et de manière surprenante, toutes les cellules hiPS ALMS prolifèrent (Figure 61, 100% des cellules sont Ki67 positives). Cependant, les cellules hiPS ALMS montrent une diminution significative du nombre de mitoses visualisées par le pourcentage total de cellules exprimant la protéine mitotique pHH3 (Figure 61, B). Nous observons également par IF une légère diminution (non significative) du nombre de cellule en phase S ayant incorporé le BrdU (Figure 61, B). Pour un même nombre de cellules hiPS ALMS en cycle (Ki67 positives), nous observons donc moins de cellules en division. Afin d'étudier plus en détails les différentes phases du cycle cellulaire, nous avons réalisé des expériences de tri cellulaire après marquage à l'iodure de propidium (Figure 61, C-D). Après quantification de la proportion de cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire (G1, S, G2 et M), nous avons constaté, comparativement aux hiPS WT, une diminution significative de la proportion de cellules en phases G1, S et M et une augmentation de la proportion de cellules hiPS ALMS en phase G2 (Figure 61, D). Ces résultats suggèrent que les cellules hiPS ALMS sont bloquées en phase G2, avant d'entrer en division. Zulato *et al.* ont montré par une analyse du transcriptome des fibroblastes ALMS que de nombreux régulateurs du cycle cellulaire étaient diminués comparativement aux fibroblastes WT (Zulato et al., 2011). Nous avons donc étudié plus en détails l'expression de quelques régulateurs associés à la progression du cycle cellulaire tels que les cyclines, et des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN tels que les hélicases, les topoisomérases et les primases. Par RT-PCR quantitative, nous observons que l'expression de ces régulateurs est globalement diminuée dans les hiPS ALMS (Figure 61, E et F). De manière intéressante, l'expression des cyclines A et B, et leur CDK associée, CDK1, nécessaire à l'entrée en phase M, est drastiquement diminuée (Figure 61, E). La diminution des cellules en phase S semble être expliquée par une diminution d'expression de la cycline E2 (régulant la transition G1-S) et de plusieurs protéines impliquées dans la réplication de l'ADN

(Figure 61, F). La mutation ne semble pas conduire à la mort cellulaire des hiPS ALMS, visualisée par un marquage de l'Annexine V (Figure 61, G).

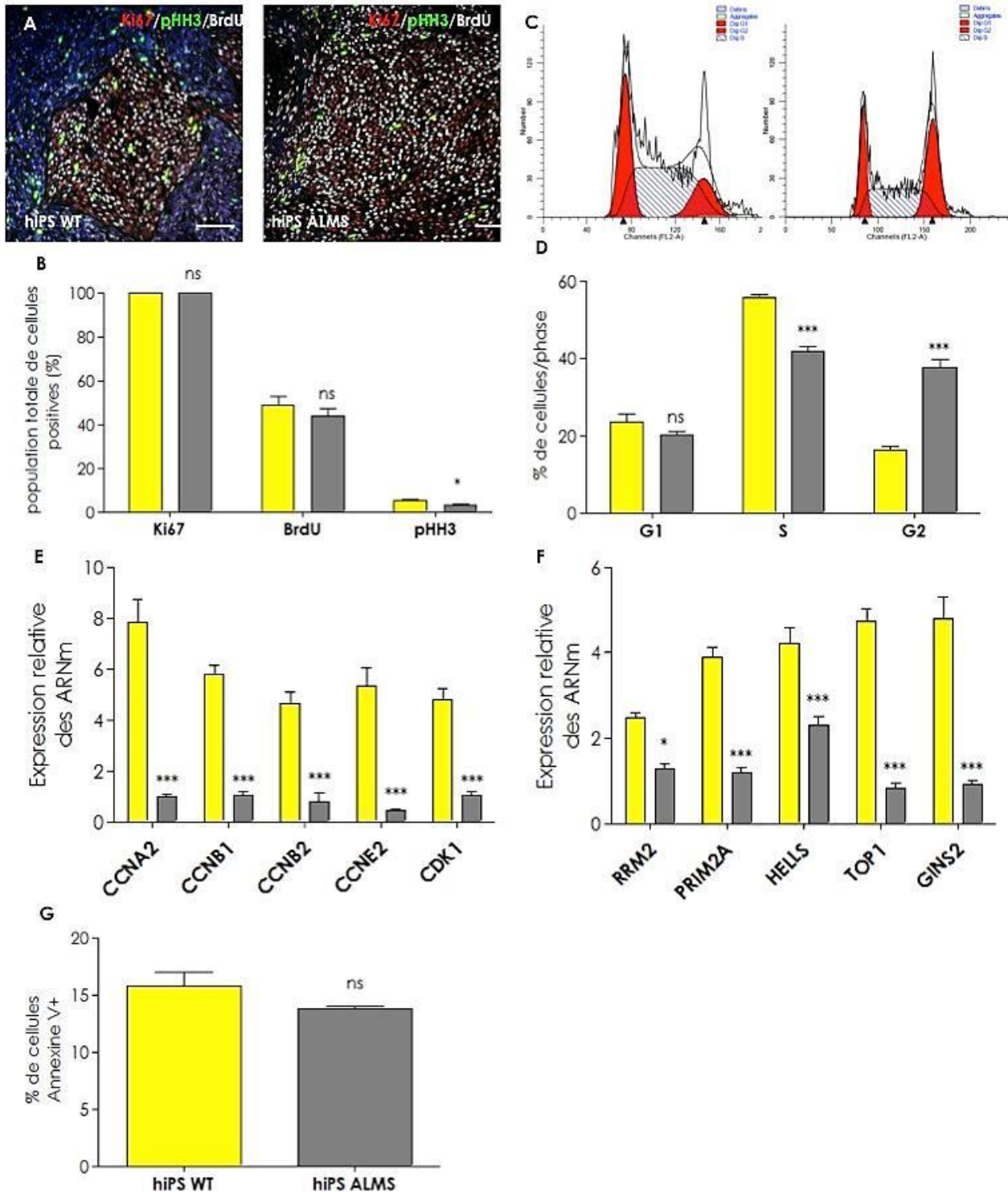


Figure 61: Etude de la prolifération des cellules hiPS ALMS. Histogrammes jaunes = hiPS WT et gris = hiPS ALMS. A : Immunomarquages de Ki67, pHH3 et BrdU (après 2h d'incorporation). Barres d'échelle = 100µm. B : Quantification du nombre de cellules Ki67, pHH3 et BrdU positives. C : Etude du cycle cellulaire par cytométrie de flux après un marquage à l'iodure de propidium. D : Quantifications de la proportion des différentes phases du cycle cellulaire après tri cellulaire. E-F : RT-PCR quantitative de l'expression de plusieurs régulateurs impliqués dans la progression du cycle cellulaire (E) et dans la phase S (F). G : Proportion de cellules en apoptose Annexine V positives par cytométrie de flux. Analyses statistiques : 2 way ANOVA, n=3, « ns » = p>0,05 ; « * » p<0,05 ; « ** » : p<0,01 ; « *** » : p<0,001 ; barres d'erreur = SEM. Abréviations : CCNA2=cycline A2, CCNB1=cycline B1, CCNB2=cycline B2, CCNE2=cycline E2, CDK1=kinase cycline-dépendante 1, RRM2=Ribonucleotide Reductase M2, PRIM2A=primase 2A, HELLS=Helicase, Lymphoïd Specific, TOP1=topoisomérase 1 et GINS2=DNA Replication Complex GINS protein PSF2.

Nous avons également étudié la prolifération des cellules hOSCs ALMS par immunomarquages de Ki67, pHH3 et de BrdU (après 4h d'incorporation) (Figure 62). Nous avons calculé la proportion des cellules positives pour les différents marqueurs et mis en évidence des problèmes de prolifération pour les cellules issues de sujet souffrant du syndrome d'Alström. La prolifération des hOSCs ALMS visualisée par immunomarquage Ki67, semble diminuée (non significativement). De plus, au vu du marquage de pHH3 mitotique et du BrdU, la phase M et S, semblent également légèrement affectées chez les progéniteurs otiques mutés (Figure 62, A-B). Nous avons réalisé des expériences de tri cellulaire après marquage à l'iodure de propidium pour étudier les différentes phases du cycle cellulaire des hOSCs ALMS et WT. Après analyse, la proportion des cellules ALMS en phase S est significativement diminuée par rapport aux hOSCs WT. La grande majorité des hOSCs ALMS semblent bloquées en phase G1 (Figure 62, E). De manière surprenante, très peu de cellules hOSCs en G2 ont été détectées. Aucune augmentation significative du nombre de cellules en apoptose n'est pas observée dans les cellules hOSCs mutantes (par tri cellulaire après un immunomarquage de l'ANNEXIN V) (Figure 62, C). Par qRT-PCR, nous avons montré que l'expression de plusieurs cyclines et enzymes nécessaires à la réplication était diminuées (Figure 62, F et G).

Ces résultats confirment que la protéine ALMS1 associée au centrosome, joue un rôle dans le cycle cellulaire chez l'homme. Une étude plus détaillée des intervenants du cycle cellulaire est nécessaire pour élucider les mécanismes qui impliquent la diminution de prolifération observée.

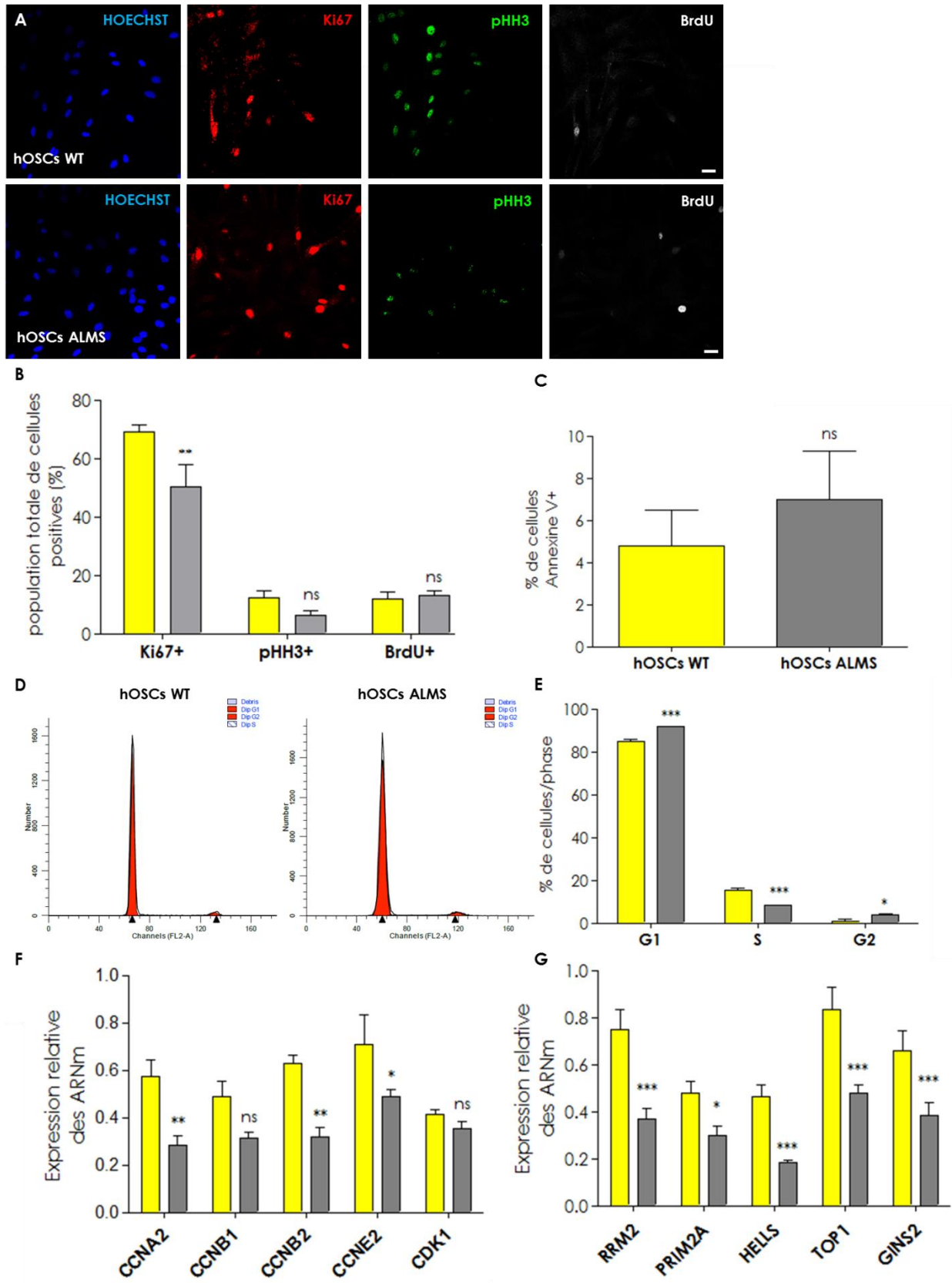


Figure 62: Etude de la prolifération au stade progéniteur. Histogrammes jaunes = hOSCs WT et gris = hOSCs ALMS. A : Immunomarquages de Ki67, pHH3 et BrdU (après 4h d'incorporation). Barres d'échelle = 10μm. B : Quantification du nombre de

cellules Ki67, pHH3 et BrdU positives. C : Proportion de cellules en apoptose Annexine V positives par cytométrie de flux D : Etude du cycle cellulaire par cytométrie de flux après un marquage avec de l'iodure de propidium. E : Quantifications de la proportion des différentes phases du cycle cellulaire après tri cellulaire. F-G : L'expression des gènes de plusieurs régulateurs du cycle cellulaire impliqués dans la progression du cycle cellulaire (F) et dans la phase S (G). Analyses statistiques : 2 way ANOVA, n=3, « ns » = $p > 0,05$; « * » $p < 0,05$; « ** » : $p < 0,01$; « *** » : $p < 0,001$; sauf pour C : T test ; $p = 0,4$; barres d'erreur = SEM. Abréviations : CCNA2=cycline A2, CCNB1=cycline B1, CCNB2=cycline B2, CCNE2=cycline E2, CDK1=kinase cycline-dépendante 1, RRM2=Ribonucleotide Reductase M2, PRIM2A=primase 2A, HELLS=Helicase, Lymphoïd Specific, TOP1=topoisomérase 1 et GINS2=DNA Replication Complex GINS protein PSF2.

Les capacités de prolifération d'une cellule normale diminuent avec son état de différenciation. Ainsi, une sortie de cycle cellulaire est associée à un processus de différenciation terminale (Buttitta et al., 2007). L'analyse histologique de coupe cochléaire provenant de patients sourds atteints du syndrome d'Alström (post-mortem), a révélé un nombre anormalement élevé de cellules constituant l'organe de Corti (cellules de soutien et cellules ciliées) (Nadol et al., 2015). Nous avons donc réalisé les immunomarquages de prolifération (Ki67) sur les cellules humaines après 10 jours de différenciation en cellules ciliées (comme décrit plus haut) et observé une prolifération anormale des cellules mutées différenciées. En effet, le nombre de cellules humaines mutées en prolifération (double positives pour le marqueur de noyaux humains et Ki67) après 10 jours de différenciation est significativement plus élevé par comparaison aux cellules différenciées saines (Figure 63). Ceci suggère que les cellules différenciées mutées chez l'homme semblent capables de ré-entrer dans le cycle cellulaire. Une étude plus détaillée de ces cellules en prolifération est nécessaire pour connaître leur destin.

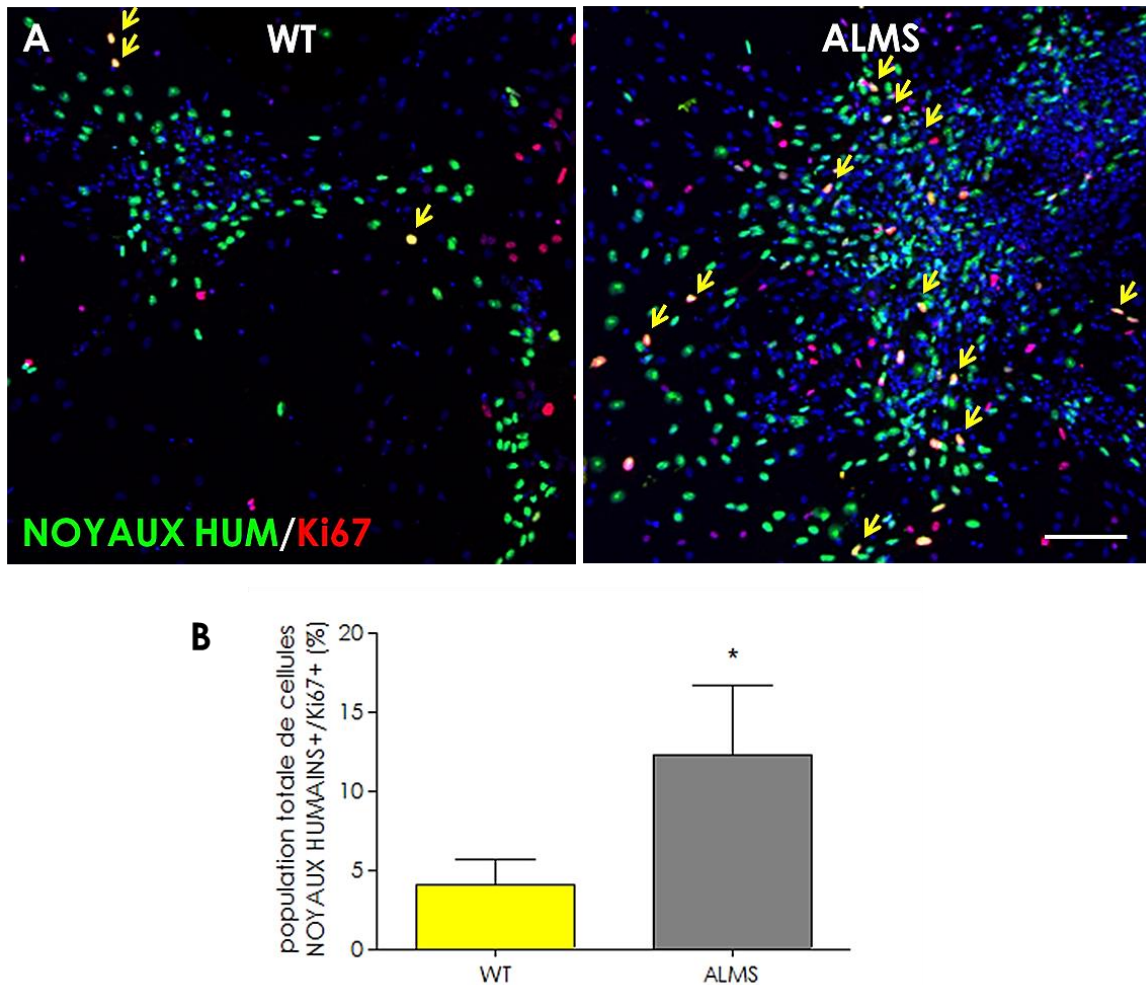


Figure 63: Etude de la prolifération des cellules humaines différenciées après 10 jours de co-culture. A : visualisation du nombre de cellules WT et ALMS qui co-expriment (flèches jaunes) NOYAUX HUMAINS et Ki67. Barre d'échelle =50µm. B : Quantifications. Analyse statistique : T test de Student, n=6, p=0,0159 ; barres d'erreur = SEM.

4.3 Étude de la ciliogenèse

Il a été montré que la protéine ALMS1 est exprimée au niveau du centrosome de toutes les cellules cochléaires, en développement et adultes mais son rôle exact dans la mise en place du cil primaire reste cependant méconnu (Jagger et al., 2011 ; Li et al., 2007). Pour étudier la formation du cil au stade progéniteur, les hOSCs sont cultivées sans facteur de croissance pendant 48h puis fixées. Nous avons tout d'abord mesuré la longueur du cil (marqué par l'AcTUB (TUBULINE acétylée) développé par les hOSCs WT et ALMS et observé que la longueur du cil des hOSCs

ALMS est significativement inférieure à celle des cils des hOSCs WT (Figure 64, A-B). D'autre part, nous avons comparé le nombre total d'hOSCs WT et ALMS ayant développés un cil (après 48h sans facteur de croissance). Le nombre de cellules qui développe un cil primaire est par contre identique (Figure 64, C). Ces résultats suggèrent que la protéine ALMS1 ne semble pas nécessaire pour induire la formation du cil mais joue un rôle dans le développement et la morphogenèse du cil primaire.

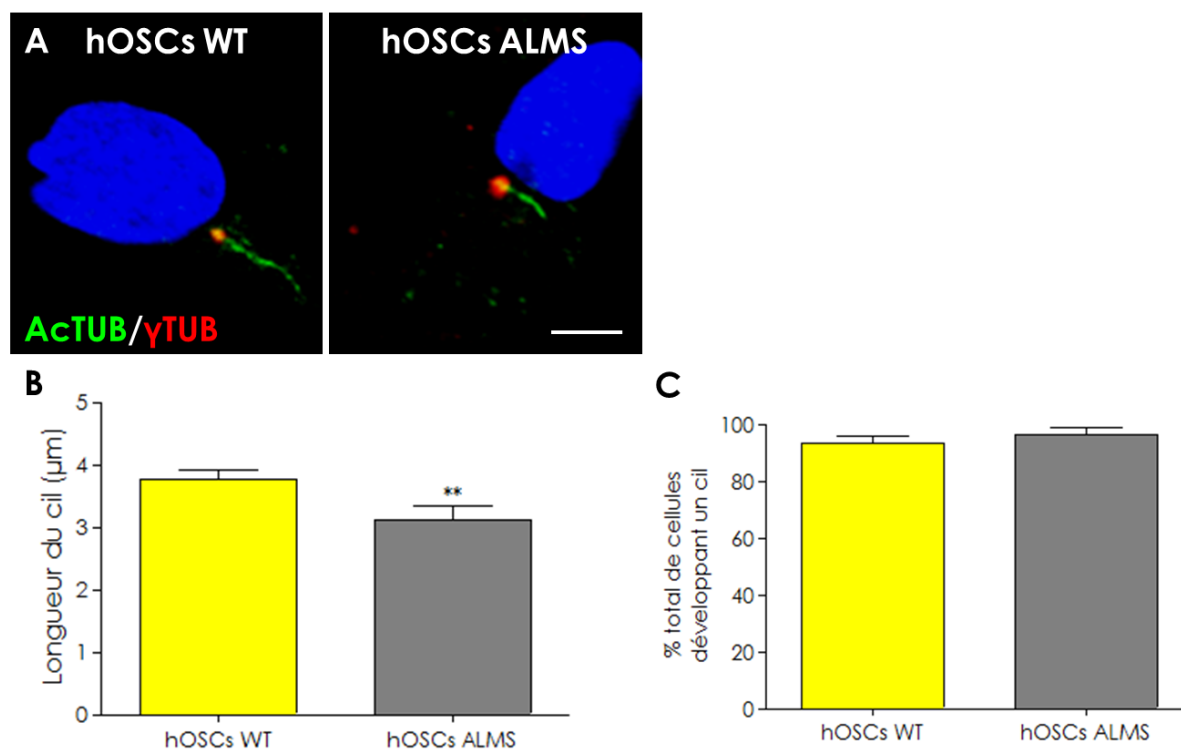


Figure 64 : Etude de la ciliogenèse au stade progéniteur après 48h sans facteurs de croissance. A-B : longueur du cil (ActTUB). C : nombre de cellule développant un cil. Barre d'échelle = 2µm. Analyses statistiques : T test, barres d'erreur = SEM, A : n=75cils, p=0.0015 ; B : n=125 cellules, p=0,1146.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

Discussion et perspectives

1. Les cellules hiPS WT se différencient en une population homogène de progéniteurs otiques

Sur base de la littérature disponible, nous avons mis au point un protocole de différenciation des hiPS WT en cellules ciliées sur base de celui décrit par Oshima en 2010 à partir de mES principalement et plus récemment celui décrit par Ronaghi *et al.* à partir de hES (Oshima et al., 2010; Ronaghi et al., 2014). Lors du développement embryonnaire, la sécrétion de morphogènes et de facteurs de croissance selon des gradients temporels et spaciaux très précis induit la formation de cellules progénitrices puis de cellules cochléaires (Lleras-Forero and Streit, 2012). Très peu de données relatives au développement de l'oreille interne sont disponibles chez l'homme et la majorité des facteurs de croissance et morphogènes utilisés dans les protocoles de différenciation proviennent d'études développementales réalisées chez la souris ou le poulet. L'adaptation des protocoles de différenciation aux cellules humaines est complexe car les facteurs de croissance diffèrent selon les espèces et le développement embryonnaire est beaucoup plus long chez l'homme (Rossant, 2015).

La première étape du protocole de différenciation est la formation d'ectoderme par l'inhibition des voies mésodermiques et endodermiques pendant 6 jours (Oshima et al., 2010; Ronaghi et al., 2014). Au terme de cette étape, seule la capacité à se différencier ultérieurement en progéniteurs otiques et la diminution de l'expression des marqueurs mésodermique (tel que BRACHYURY par exemple) et endodermique (tel que SOX17 par exemple), nous permet de conclure indirectement qu'il y a formation de cellules d'ectoderme non neural. Une meilleure caractérisation des cellules par des marqueurs spécifiques de l'ectoderme non neural antérieur, tels que DLX5, GATA3 et FOXi1, est nécessaire après cette étape (Lleras-Forero and Streit, 2012). Il a été montré que les voies BMP et WNT jouent un rôle primordial dans l'induction du domaine pré-placodale (PPR) chez la souris (voir 4.1 *Différenciation précoce*) (Koehler et al., 2013). Par exemple, la voie BMP doit d'abord être induite pour générer de l'ectoderme non neural, puis être inhibée pour induire de l'ectoderme preplacodal (Koehler et al, 2013). A ce

stade, une induction plus spécifique des cellules de la PPR à partir de l'ectoderme chez l'homme, doit être mise au point.

La deuxième étape du protocole de différenciation est l'induction des progéniteurs otiques de J6 à J20. Dans le développement embryonnaire normal, PAX2 est exprimé dans la majorité des cellules qui formeront les épithéliums sensoriels de l'oreille interne (Chen and Streit, 2013; Ronaghi et al., 2014; Torres et al., 1996). La voie des FGFs joue un rôle primordial dans ce processus en induisant notamment l'expression de PAX2 (Freter et al., 2008; Martin and Groves, 2006a) mais chez l'homme, les ligands FGFs spécifiquement impliqués dans l'induction otique sont encore inconnus. Différents FGFs tels que FGF3, FGF10 et FGF19, sont utilisés dans les protocoles de différenciation à partir de hES (Tableau 3) et semblent jouer un rôle dans l'induction otique chez l'homme. De plus, durant le développement cochléaire murin, il a été montré que les différents récepteurs aux FGFs (FGFR) sont exprimés différemment dans le temps (Pickles, 2001; Pickles and Chir, 2002). Par exemple, toutes les cellules progénitrices présentes dans la vésicule otique expriment FGFR2, ensuite les cellules présentes dans la région sensorielle surexpriment FGFR1 et FGFR3 (Pickles, 2001). Pour ces raisons, nous avons utilisé le FGF2 comme inducteur global de la voie FGFs car il lie les 4 FGFR connus (Plotnikov et al., 2000; Plotnikov et al., 1999). De manière surprenante, lorsque nous avons remplacé FGF2 par FGF3 et FGF10, décrits par Chen *et al*, pour induire les progéniteurs otiques à partir de hES (Chen et al., 2012), nous n'avons pas observé l'expression des marqueurs otiques tels que PAX2, SIX1 ou PAX8 (données non montrées). Cette différence peut s'expliquer par le fait que Chen *et al*. appliquent les FGFs aux cellules hES dès le premier jour du protocole de différenciation. FGF3 et FGF10 pourraient ainsi jouer un rôle plus précoce dans l'induction des progéniteurs otiques humains. Nous testons actuellement l'effet du FGF19 (Ronaghi et al., 2014), dans de nouvelles expériences d'induction otique. Le FGF19 est spécifiquement impliqué dans l'induction otique chez le poulet (Sai and Ladher, 2015). Nous avons amélioré le protocole en traitant les cultures avec du HS. En effet, nous avons montré que l'ajout de HS, en présence de FGF2, augmente significativement le nombre de progéniteurs otiques à partir de J9 et que l'allongement de la durée du traitement par FGF2/HS jusqu'à J20 augmente de manière significative la population des progéniteurs otiques double positifs pour PAX2/PAX8 et PAX2/SIX1 jusqu'à 25%. Le sulfate d'héparine (HS) stabilise la liaison du FGF2 au FGFR et amplifie la signalisation FGF

(Elenius and Jalkanen, 1994; Mohammadi et al., 1998). L'induction otique *in vivo* est bloquée par l'inhibition de la signalisation FGF (Alsina et al., 2004; Martin and Groves, 2006a). Nous avons également montré que l'ajout d'une forte dose de FGF2, d'une part, induit l'expression des marqueurs de progéniteurs otiques et, d'autre part, inhibe le destin neurectodermique. Nous avons confirmé ces résultats en ajoutant du SU5402, un inhibiteur de la voie des FGFs, pendant l'induction otique. Le SU5402 inhibe aussi la production endogène de FGF2 par les cellules dans le milieu de culture (Padanad et al., 2012). L'ensemble de ces résultats confirme le rôle très important de la voie des FGFs lors de l'induction otique chez l'homme et montre le rôle primordial du FGF2 lors de cette étape.

En plus de la nécessité d'activer la voie des FGFs, l'activation de la voie WNT, via WNT1 et WNT3a, semble amplifier l'induction otique chez le poulet et la souris (Ohyama et al., 2006; Riccomagno et al., 2005). Nous avons donc également testé l'ajout de WNT3a au milieu de culture. Malheureusement nous n'avons pas amélioré la différenciation en progéniteurs otiques (données non montrées). Ce résultat peut s'expliquer de trois manières : 1/ la durée d'exposition et la concentration de Wnt doivent être adaptées, 2/ WNT3a ne joue aucun rôle dans l'induction otique chez l'homme ou 3/ les cellules en culture expriment déjà des niveaux suffisants de ligand WNT. Cette dernière hypothèse est supportée par l'étape de différenciation terminale des cellules hOSCs en cellules ciliées qui se déroule en absence de facteur de croissance.

A J20, les cellules sont détachées et transférées en conditions « hOSCs » permettant de sélectionner et d'enrichir la culture en cellules otiques (jusqu'à 80%) comme démontré par Chen *et al.* (Chen et al., 2012). Lors de ce passage, les cellules différenciées mourront et les hOSCs continueront de proliférer. Le milieu de culture utilisé en condition hOSCs est celui développé par l'équipe du Dr. Rivolta, pour la culture de cellules souches fœtales humaines dérivées de l'oreille interne (hFASCs pour « human fetal auditory stem cells ») (Chen et al., 2009). Ces cellules hFASCs sont isolées de cochlées d'embryons humains âgés de 9 à 10 semaines et mises en culture en présence d'un milieu composé d'une combinaison d'EGF, FGF2 et IGF1 (Chen et al., 2009). La combinaison de ces 3 facteurs semble nécessaire au maintien des hFACS en culture pendant plusieurs passages (Chen et al., 2009). Cette méthode d'enrichissement basée sur un passage des cellules dans un milieu sélectif est utilisée par Chen *et al.* pour générer une

population homogène de progéniteurs otiques humains à partir de cellules hES et est également utilisée dans plusieurs protocoles de différenciation en cellules souches neurales (hNSCs pour « human Neural Stem Cells ») (Chambers et al., 2009; Chen et al., 2012; Koch et al., 2009; Shin et al., 2006). Nous avons appliqué pour la première fois cette méthode à partir de cellules hiPS pour la génération d'une population homogène de progéniteurs otiques. De manière surprenante, nous observons une diminution drastique de l'expression des marqueurs des progéniteurs neurectodermiques (PAX6 et SOX1) après le passage en conditions hOSCs alors que l'EGF et le FGF2 sont également nécessaires au maintien en culture des progéniteurs neuronaux humains (Koch et al., 2009; Ostenfeld and Svendsen, 2004). La présence d'IGF1 à forte concentration dans le milieu de culture hOSCs (50ng/ml) semble jouer un rôle important. En effet, l'IGF1 a un rôle, primordial dans le maintien de la prolifération des progéniteurs otiques en culture (Camarero et al., 2001; Camarero et al., 2003; Zheng et al., 1997). De plus, il semble déterminant dans le maintien de l'état « progéniteur » des cellules otiques humaines (Chen et al., 2009). L'étude plus approfondie de l'expression des marqueurs de cellules neurales différenciées, telles que MAP2 et TUBB3, dans les cultures d'hOSCs nous permettra de vérifier cette hypothèse et de connaître avec certitude le devenir des quelques cellules dérivées de neurectoderme encore présentes après le passage à J20.

Nous n'avons pas observé d'effet de la culture à long terme sur l'expression des marqueurs de progéniteurs otiques des cellules hOSCs. Après plusieurs passages, les hOSCs continuent d'exprimer les marqueurs de progéniteurs otiques et de prolifération. Cependant, une étude plus détaillée du potentiel de différenciation sera nécessaire. En effet, il a été montré que le maintien en culture d'une population de progéniteurs multipotents humains, telle que les hNSCs, réduit ses capacités de différenciation en neurones de projection et dopaminergiques (Elkabetz et al., 2008).

2. Les cellules hOSCs forment des rosettes otiques après 10 jours de différenciation

Les hOSCs WT sont capables de se différencier en cellules ciliées exprimant les marqueurs de différenciation terminale ATOH1 et MYO6. Leur différenciation n'est cependant possible qu'en présence de cellules embryonnaires otiques de souris à E14, sans ajout de facteur de croissance spécifique au milieu. Dans ces conditions, les cellules ciliées humaines sont entourées de cellules

murines exprimant les marqueurs de cellules de soutien SOX9 et SOX2. En absence de cellules murines nourricières, les hOSCs ne se différencient pas en cellules ciliées et aucun marqueur de différenciation otique n'est observé (données non montrées). Afin de remplacer ces cellules murines nourricières, nous avons testé de nombreuses conditions de culture telles que la culture sur gélatine ou sur poly-L-ornitine/laminine ou encore en présence de milieu conditionné de cellules otiques murines. Cependant, ces conditions de culture n'ont pas permis d'obtenir une différenciation des hOSCs en cellules ciliées. Dès lors, un contact cellulaire est nécessaire à la différenciation des hOSCs et d'autres types de cellules nourricières telles que les MEFs devront être testées.

L'efficacité de la différenciation terminale en cellules ciliées est faible (<1%). Plusieurs molécules telles que l'EGF (Doetzlhofer et al., 2004), le BMP4 (Li et al., 2005), l'acide rétinoïque (Helyer et al., 2007) ou encore le LY411575, un inhibiteur de la voie NOTCH (Mizutari et al., 2013) sont connues pour favoriser la différenciation des progéniteurs otiques en cellules ciliées, que ce soit chez la souris ou chez l'homme. Par exemple, l'ajout d'EGF, de BMP4 ou de LY411575 à une culture d'explant cochléaire induit l'expression d'ATOH1 et la formation de cellules ciliées (Doetzlhofer et al., 2004; Li et al., 2005; Mizutari et al., 2013) tandis que l'acide rétinoïque induit la différenciation en cellule ciliée *in vitro* (Helyer et al., 2007). Nous avons testé l'ajout de ces différentes molécules (seules ou en combinaison) et nous n'avons pas observé d'augmentation de la production de cellules ciliées supplémentaires en comparaison aux cultures sans molécules (données non montrées). La mise au point d'une méthode de différenciation en 3D serait avantageuse car elle ne nécessite pas de tissu exogène ou de facteur de croissance non défini. Cette méthode de culture, développée par l'équipe du Dr. Sasai, pour différencier des hES en cellules de la rétine, est basée sur la formation d'agrégats cellulaires qui s'auto-organisent en trois dimensions dans une matrice de protéines extracellulaires (le Matrigel™) (Eiraku et al., 2011; Eiraku et al., 2008). Cette technique a été appliquée avec succès récemment, à partir de cellules mES, pour générer de l'épithélium sensoriel de l'oreille interne qui semble être structurellement et physiologiquement comparable à un épithélium sensoriel natif (Koehler and Hashino, 2014).

L'organisation des cellules différenciées en rosettes dans lesquelles la partie apicale des cellules est dirigée vers l'intérieur (les noyaux se retrouvant en périphérie) suggère l'établissement d'une polarité apico-basale et le développement de structures stéréociliées apicales. En collaboration avec l'équipe du Pr. Marc Thiry (GIGA-Neurosciences, Ulg), nous étudierons les cellules cochléaires différenciées par microscopie électronique à balayage. Cette technique nous permettra de visualiser et d'étudier plus en détail la structure apicale présente à la surface des cellules ciliées différenciées. De plus, les propriétés électrophysiologiques de ces cellules devront être étudiées plus en détails pour nous permettre de confirmer les résultats obtenus en présence du fluorochrome FM1-43.

3. Génération d'hiPS ALMS à partir de fibroblastes d'un patient sourd atteint du syndrome d'Alström

Nous avons généré avec succès des hiPSCs ALMS qui expriment les marqueurs de pluripotence et d'autorenouvellement caractéristiques des cellules hES, possèdent un caryotype normal et sont pluripotentes. Ainsi, la génération de ces cellules hiPS à partir des patients ALMS constitue une source nouvelle et inépuisable de matériel humain unique disponible pour l'étude du syndrome d'Alström. La mutation homozygote récessive au niveau de l'exon 8 (c.[3425C>G]+[3425C>G]) présente chez le patient G1608A (patient n°2 ; Zulato et al., 2011) engendre un arrêt du cadre de lecture par l'apparition d'un codon STOP prématuré (p.S1142X). Nous avons détecté la présence de l'ARNm ALMS1 par RT-PCR (donnée non montrée) et nous avons montré que la protéine ALMS1 mutée n'est plus détectée dans les hiPS ALMS. Cependant, l'anticorps utilisé pour l'IF (ALMS1 N-term ; Abcam ; ab84892) reconnaît une portion de la protéine en aval de la mutation et ne nous permet donc pas de conclure quant à l'expression d'une éventuelle protéine tronquée.

4. Les cellules hiPS ALMS semblent se différencier correctement en hOSCs puis en cellules ciliées mutées

Pour élucider les mécanismes qui sous-tendent la surdité neurosensorielle présente chez les patients atteints du syndrome d'Alström, nous avons tout d'abord étudié les capacités de différenciation des cellules hiPS ALMS en cellules hOSCs puis en cellules ciliées, en

comparaison à chaque fois avec leurs homologues sauvages. Chez ces patients, la capacité des cellules à générer des progéniteurs otiques ne semble pas affectée. Nous avons, en effet, généré des progéniteurs otiques ALMS en utilisant le même protocole d'induction sans différence significative avec les hOSCs WT. De la même manière, le potentiel de différenciation des hOSCs en cellules ciliées mutées ne semble pas affecté puisque nous sommes en mesure d'observer des cellules humaines mutées co-exprimant MYO6 et ATOH1 après 10 jours de différenciation. Ces résultats suggèrent que les problèmes, à l'origine de la surdité neurosensorielle observée chez les patients, ne sont pas liés directement à la capacité de production des cellules ciliées. Ceci est en accord avec l'analyse histologique, *post-mortem* des cochlées de 2 patients ALMS qui a révélé la présence de cellules ciliées (Nadol et al., 2015). Dans les 2 cas, la surdité neurosensorielle développée par ces patients semble principalement être attribuable à une dégénérescence progressive des cellules ciliées au cours de la vie du patient, suivie d'une perte neuronale (secondaire à la perte des cellules ciliées) (Nadol et al., 2015). Ces résultats sont également en accord les observations de Jagger *et al.* qui décrivent une perte progressive des cellules ciliées chez les souris invalidées pour ALMS1 (Jagger et al., 2011). Malheureusement, à l'heure actuelle, notre protocole de différenciation ne nous permet pas de maintenir les cellules ciliées en culture plus de 10 jours (détachement spontané des cellules) et d'étudier le degré de maturité de ces cellules. De plus, nous ne pouvons pas exclure un effet de la mutation sur la différenciation puisque la production de cellules ciliées ALMS est moins efficace en comparaison aux cellules ciliées WT et l'organisation en rosette observées chez les cellules ciliées WT semble perturbée chez les cellules ciliées mutées.

Pour une meilleure caractérisation du modèle pathologique humain, nous étudierons plus en détails le développement du kinocilium que nous tenterons de visualiser après immunomarquage de l'acétyl-tubuline, une protéine constitutive de ce dernier, et des différentes parties qui le composent tels que le corps basal (gamma-TUBULINE) et l'axonème (les protéines IFTs, la KINESINE et la DYNEINE par exemple) (Oh et al., 2015; Stooke-Vaughan et al., 2012). De plus, nous tenterons de mettre en évidence les stéréocils des cellules normales et mutées. Nous marquerons l'actine polymérisée (ACTINE-F), présente en très grande quantité dans les stéréociles, par incubation avec de la phalloïdine et nous procéderons à des immunomarquages de l'ESPINE, une protéine spécifiquement présente dans les stéréocils (Sekerikova et al., 2011).

5. Perturbation du cycle cellulaire dans les cellules mutées pour ALMS1

Ensuite, nous nous sommes focalisés sur l'étude de la prolifération et de la ciliogenèse, qui semblent être perturbées dans différents types de cellules murines et humaines mutées pour ALMS1 (Girard and Petrovsky, 2011; Jagger et al., 2011; Shenje et al., 2014; Zulato et al., 2011), aux différents stades développementaux (hiPS, hOSCs et cellules ciliées) du modèle pathologique humain développé. Pour toutes ces expériences, des cellules hiPS WT dérivées d'un donneur sain ont été utilisées comme lignée contrôle.

Nous n'observons pas de diminution de prolifération par immunomarquage des cellules hiPS ALMS avec Ki67 mais nous avons par contre montré une augmentation significative du nombre de cellules hiPS ALMS en phase G2 et une diminution de leur nombre en mitose (positives pour pHH3). Zulato *et al* ont montré que les fibroblastes ALMS à partir desquels les hiPS mutées ont été générées montrent également un allongement du cycle cellulaire par rapport aux fibroblastes WT (Zulato et al., 2011). Le cycle cellulaire des cellules hES et hiPS – comme n'importe quelle autre type cellulaire en prolifération - est constitué des quatre phases G1, S, G2 et M mais la phase G1 est considérablement réduite par rapport à la plupart des cellules en prolifération (Becker et al., 2006; Becker et al., 2010). Ainsi, la longueur normale du cycle cellulaire est réduite (15h) par rapport à une cellule somatique (24h). La transition des différentes phases est sous le contrôle des régulateurs du cycle cellulaire : les cyclines et leur kinase associées (CDKs) (De Paepe et al., 2014). Les cyclines sont exprimées à différents moments du cycle cellulaire tandis que les CDKs sont constitutivement exprimés (Morgan, 1997). Les cyclin et B, par exemple, sont exprimées durant la phase S et G2, tandis que les cyclines E et D sont exprimées durant la phase G1 (Morgan, 1997). Leur accumulation permet la progression du cycle cellulaire en passant par trois grands points de contrôle : G1-S (après la mitose), G2-M (après la réplication) et lors de la mitose. La réduction de la longueur de la phase G1 caractéristique des cellules hES et hiPS est associée à une augmentation de l'expression des cyclines D et E (Becker et al., 2006; Neganova et al., 2009). Inversement, l'allongement d'une phase du cycle cellulaire est associé à une diminution de l'expression des cyclines impliquées (DiPaola, 2002; Neganova et al., 2011). Nous avons montré une diminution de l'expression des cyclines A et B et de leur

CDK associées, CDK1, qui régulent ensemble la transition G2-M supportant cette observation et l'accumulation des cellules mutées en G2. La protéine ALMS1 est exprimée à la base du centrosome, un organelle composé de deux centrioles (Andersen et al., 2003; Hearn et al., 2005). Le centrosome constitue le centre organisateur des microtubules. Au cours du cycle cellulaire, à partir de la phase G1, il se duplique de telle sorte que la cellule possède 2 paires de centrioles à l'entrée de G2 (Zou et al., 2005). Pendant toute l'interphase, les deux centrosomes sont liés entre eux par des fibres émanant de leur extrémité proximale basale (où ALMS1 est exprimée) (Lim et al., 2009). Lors de la transition G2-M, les centrosomes se détachent pour permettre la formation du fuseau mitotique et le début de la mitose (Bahe et al., 2005; Fry et al., 1998; Mayor et al., 2002). A la fin de la mitose, chaque cellule possède ainsi son centrosome. Le centrosome joue un rôle important en recrutant de nombreux régulateurs du cycle cellulaire (Azimzadeh and Bornens, 2007; Doxsey et al., 2005) notamment lors de la transition G2-M en favorisant le recrutement et l'activation de nombreuses protéines régulatrices telles que la cycline B, CDK1 et APC/C (Wang et al., 2009). Son implication dans la régulation de la transition G1-S est beaucoup moins connue. Knorz *et al.* ont montré qu'une diminution de l'expression d'ALMS1 par siARN, conduit à une séparation prématurée des centrosomes à partir de la phase G1 (Knorz et al., 2010). Nous avons également observé une séparation anormale des centrosomes dans les hiPS ALMS. Mikule *et al.* ont montré qu'un défaut dans l'intégrité du centrosome induit la voie p53-p21 et un arrêt du cycle cellulaire au point de contrôle G1-S (Mikule et al., 2007). La transition G1-S est régulée par deux voies principales qui convergent toutes les deux vers l'activation de CDK2 nécessaire à la progression vers la phase S (Bartek and Lukas, 2001b). Lors de l'arrêt du cycle en G1, ces deux voies se distinguent par leur vitesse d'exécution à cause de leurs intervenants moléculaires. La voie classique « lente » conduit à la stabilisation de p53 suivie de l'augmentation de l'expression puis de l'activation de p21, un inhibiteur de CDK. Par la voie « rapide », la dégradation de la phosphatase CDC25A (activatrice de CDK2) engendre un arrêt rapide mais transitoire du cycle cellulaire avant la réplication de l'ADN (Bartek and Lukas, 2001a). Les cellules hiPS sont démunies de ce point de contrôle classique lors de la transition G1-S (Becker et al., 2010) et sont incapables d'activer un arrêt de la phase G1 via la voie classique dépendante de p53 (Barta et al., 2010; Hong and Stambrook, 2004), contrairement aux cellules somatiques où le blocage à la transition G1/S est médié par p53 (Kapinas et al., 2013). De plus, alors qu'un arrêt des cellules en phase G2 conduit les cellules à l'apoptose revu dans (Kapinas et al., 2013), nous n'observons pas

d'augmentation du nombre de cellules hiPS ALMS apoptotiques positives pour l'ANNEXINE V (donnée non montrée) et aucune différenciation spontanées des hiPS due à une sortie de cycle cellulaire (100% des cellules Ki67 positives) (Becker et al., 2006). Ces résultats suggèrent donc que la séparation prématurée des centrosomes n'engendre pas un arrêt définitif en G2 mais un retard et une entrée plus lente des cellules en mitose. Ainsi, la cinétique de recrutement des régulateurs aux centrosomes pendant la phase G2 pourrait être ralentie par l'éloignement anormal des centrosomes. En effet, dans des cellules où ALMS1 est invalidée par siARN, la présence de cNAP1 (« centrosomal NEK2-associated protein 1 »), une protéine structurale importante des centrosomes qui permet l'ancrage entre ceux-ci, est diminuée au niveau du centrosome (Knorz et al., 2010). En plus de son rôle structural, cNAP1 recrute NEK2 (« NIMA-related kinase »), une protéine kinase, au niveau du centrosome (Spalluto et al., 2012). De manière très intéressante, Spalluto *et al.* ont montré que l'expression de NEK2 est induite uniquement à la fin de la phase G2 où elle engendre le détachement des deux centrosomes, nécessaire à la transition en phase M, avant d'être dégradée (Spalluto et al., 2012).

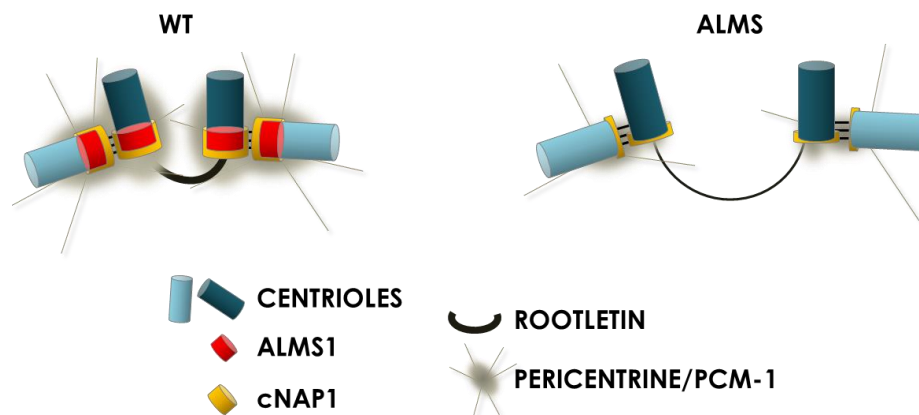


Figure 65: Modèle développé par Knorz *et al* (Knorz et al., 201). Suite à l'invalidation de ALMS1 par siARN, l'expression de cNAP1 est réduite au niveau du centrosome et une diminution de cohésion entre ceux-ci est observée. ALMS1 et cNAP1 co-localise à la base des centrosomes. ROOTLETIN est une protéine constitutive du lien qui maintient les centrosomes côte à côte durant toute l'interphase et sa phosphorylation engendre la séparation des centrosomes. Une diminution d'accumulation des protéines du matériel péri-centriolaire telle que PCM1 et une protéine constitutive du centrosome, PERICENTRINE, est également observée.

Il a été montré que les cellules mutées pour ALMS1 en prolifération possèdent des retards dans leur cycle cellulaire (Zulato et al., 2011). Il n'y a cependant à l'heure actuelle, aucun lien connu entre ce phénotype et la pathologie. Une étude plus détaillée de ces régulateurs liés au centrosome dans les cellules hiPS nous permettrait de mieux comprendre comment la séparation prématurée des centrosomes est impliquée dans le syndrome d'Alström.

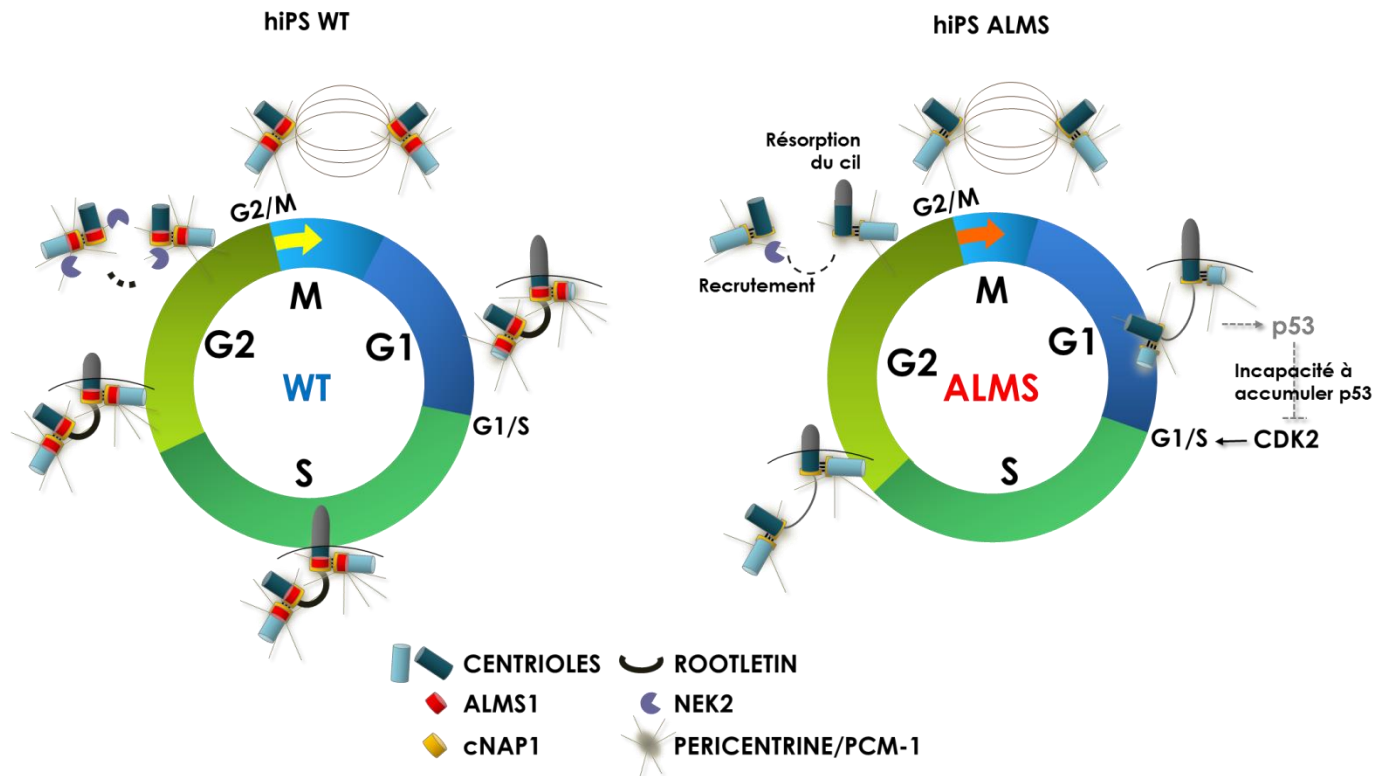


Figure 66: Défauts du cycle cellulaire des hiPS ALMS et hypothèses de travail. Les cellules hiPS ont un cycle cellulaire particulier car elles ne possèdent pas de point de contrôle classique lors de la transition G1/S. Suite à la mutation de la protéine ALMS1, les hiPS mutées sont donc incapables de bloquer leur cycle cellulaire en G1 via la voie p53-p21 et continue leur cycle cellulaire jusqu'en G2. Pendant cette phase, l'expression de NEK2 est induite. NEK2 est une kinase impliquée dans la phosphorylation de la protéine structurale qui lie les centrosomes entre eux, ROOTLETIN. De manière intéressante, NEK2 est recrutée au centrosome via cNAP1 et les protéines du matériel péri-centriolaire telle que PCM1. La diminution de cohésion des centrosomes engendrerait donc une diminution du recrutement de NEK2 au centrosome et un retard à l'entrée en mitose. De plus, NEK2 est impliquée dans la résorption du cil primaire lors du passage en mitose. Une étude plus en détails de ce processus serait intéressante car des défauts de résorption de cils sont également associés à un retard d'entrée en mitose.

Nous avons généré des hOSCs WT qui, en comparaison aux cellules hiPS WT, présentent un allongement de la phase G1 caractéristique de cellules multipotentes progénitrices (Becker et al., 2010; Kapinas et al., 2013; Neganova and Lako, 2008) Nous avons réalisé la même observation avec les hiPS et les hOSCs ALMS. Les hOSCs générées possèdent un taux de prolifération (70 à 80% de cellules Ki67 positives) similaire à d'autres types de progéniteurs neuronaux en culture dérivées de cellules hES et hiPS (Lee et al., 2009). La génération des hOSCs ALMS nous a permis de mettre en avant des défauts de prolifération et une perturbation du cycle cellulaire par comparaison aux hOSCs WT. Cette diminution de prolifération est en partie reflétée par une

légère diminution du nombre des cellules hOSCs ALMS positives pour PAX2/PAX8 par rapport au hOSCs WT. La diminution de prolifération observée dans les progéniteurs mutés engendrerait une diminution du nombre de cellules ciliées différenciées. Cette hypothèse est supportée par les problèmes de différenciation terminale des hOSCs ALMS en cellules ciliées mutées décrit dans ce travail et permettrait d'expliquer la surdité précoce des patients ALMS (Marshall et al., 2005; Zulato et al., 2011). De plus, nous avons observé une augmentation de la proportion des cellules en phases G1 et G2 et une diminution la proportion de cellules en répllication (phase S) et en mitose. Suite à une perte de cohésion des centrosomes, Mikule *et al.* ont montré que l'activation de voie p53-p21 conduisait à la sortie de cycle cellulaire en G1 (Mikule et al., 2007; Srsen et al., 2006). Pour étudier plus en détails le devenir des cellules qui sortent du cycle cellulaire, nous avons étudié l'apoptose et n'avons pas observé pas d'augmentation significative de cellules hOSCs ALMS positives pour Annexine V. En inhibant dans des fibroblastes embryonnaires humains, la PERICENTRINE et PCM-1, des protéines constituant le matériel péri-centriolaire et essentielles à la cohésion des centrosomes, Svern *et al.* ont montré que la sortie de cycle cellulaire en G1 via p53 est associée à une sénescence de ces cellules (Srsen et al., 2006). Pour tester cette hypothèse, un marquage de la β -galactosidase, une protéine associée à la sénescence (Dimri et al., 1995), devra être réalisé sur les hOSCs. En plus d'une augmentation du nombre de cellules en G1, nous observons un allongement de la phase G2 correspondant à un ralentissement à l'entrée en mitose qui pourrait être du à la perturbation du recrutement au centrosome de NEK2 via cNAP1 (Kim et al., 2015). Une étude plus approfondie de ces régulateurs est nécessaire pour confirmer cette hypothèse. Lors du développement cochléaire normale chez l'homme, à la suite d'une période de prolifération, les cellules progénitrices sorte du cycle cellulaire, entre la 10^{ème} et 11^{ème} semaine post-fécondation, en expriment p27kip1, un inhibiteur du cycle cellulaire, qui conduit à l'arrêt de la prolifération des cellules du domaine pro-sensoriel (Chen and Segil, 1999; Lee et al., 2006). Ainsi, la différenciation d'une cellule ciliée correcte est associée à une sortie de cycle cellulaire à un moment bien précis du développement cochléaire (Kopecky et al., 2013) et un défaut de cycle cellulaire peut conduire à une surdité (Barrenas et al., 2005; Kanzaki et al., 2006; Lowenheim, 1999).

6. Perturbation de la ciliogenèse dans les cellules mutées pour ALMS1

La localisation de la protéine ALMS1 au corps basal du cil primaire suggèrent un rôle de ALMS1 dans la formation et/ou la maintenance du cil primaire (Graser et al., 2007; Hearn et al., 2005; Li et al., 2007a) et classent le syndrome d'Alström comme ciliopathie (Badano et al., 2006; Marshall et al., 2011; Marshall, 2008; Nigg and Raff, 2009). Ces pathologies sont associées le plus souvent à de nombreux symptômes dont la surdité (Forsythe and Beales, 2013; Marshall et al., 2011; Mora et al., 1999). Le spectre des phénotypes observés chez les patients atteint du syndrome d'Alström est similaire à celui du syndrome de Bardet-Biedl (BBS) (Badano et al., 2006), ce qui suggère que des mutations du gène ALMS1 pourraient provoquer une surdité par un mécanisme similaire aux mutations du BBS. Il est maintenant bien établi que plusieurs gènes mutés dans BBS jouent un rôle au niveau du cil primaires et engendre, entre autre, des défauts de ciliogenèse (Ansley et al., 2003; Fan et al., 2004; Kim et al., 2004; Kulaga et al., 2004). D'autre part, la polykystose rénale, une autre ciliopathie, est caractérisée par des défauts de ciliogenèse et le développement progressif de kystes remplis de liquide, conduisant finalement à une insuffisance rénale (Wilson, 2004). La POLYCYSTINE 1 et 2, les protéines mutées dans la PKD sont exprimées au niveau du cil primaires et sont nécessaires à la signalisation induites par les cils (Nauli et al., 2003; Otto et al., 2003; Wang et al., 2004). Plusieurs équipes ont montré que les cellules hiPS et hES indifférenciées sont capables de générer un cil primaire très court en culture (He et al., 2014; Kiprilov et al., 2008; Vestergaard et al., 2016). De manière intéressante, NEK2 qui permet la séparation des centrosomes avant l'entrée en phase M, est également impliquée dans la résorption du cil primaire nécessaire à la transition correcte G2/M dans les cellules en prolifération (Kim et al., 2015; Spalluto et al., 2012). Dans les cellules en prolifération, la dégradation du cil à la fin de la phase G2 semble essentielle pour libérer le centrosome en vue de la formation des fuseaux mitotiques (Liu and Ruderman, 2006). Un défaut dans ce processus induit un retard à l'entrée des cellules en phase M (Delaval and Doxsey, 2010; Holubcova et al., 2011; Liu and Ruderman, 2006). De plus, en absence d'ALMS1, les cellules rénales embryonnaires développent un cil primaire plus court (Li et al., 2007a). Les défauts de cycle cellulaire observés dans les hiPS mutées pourraient donc être liés à leur cil primaire. Une étude plus approfondie de leur cil primaire en culture permettrait de mieux connaître les mécanismes moléculaires impliqués dans la surdité des patients ALMS. D'autre part, dans de cellules qui ne prolifèrent pas, le centrosome s'attache à la membrane cellulaire et devient le corps basal. Ce dernier agit comme modèle pour l'assemblage du cil primaire (Dawe et al., 2007; Singla and

Reiter, 2006). Nous avons donc étudié la ciliogenèse des hOSCs en les privant de facteur de croissance pendant 48h et observons une diminution significative de la longueur du cil développé par ces cellules mutées. Li *et al.*, ont fait la même observation après avoir inhiber l'expression d'ALMS1 par siARN dans des cellules rénales (Li et al., 2007a). Cette diminution de la taille des cils observés dans les progéniteurs en absence de facteurs de croissance pourrait refléter leur incapacité à générer un cil primaire correcte une fois différenciées en cellules ciliées. Cette hypothèse doit bien sûr être testée après différenciation terminale des hOSCs ALMS. De manière intéressante, en plus de participer à la cohésion des centrosomes, ALMS1 semble aussi interagir avec les composants du matériel péri-centriolaire, un ensemble de protéines qui entourent le centrosome, composé notamment par la PERICENTRINE (Dammermann and Merdes, 2002; Delaval and Doxsey, 2010; Young et al., 2000). La PERICENTRINE est exprimée au niveau du corps basal et permet notamment son ancrage dans la membrane plasmique (Muhlans et al., 2011; Zimmerman et al., 2004) et la perturbation de son expression conduit également à une diminution de la ciliogenèse (Graser et al., 2007; Martinez-Campos et al., 2004; Mikule et al., 2007; Nachury et al., 2007). Dans les cellules déplétées pour ALMS1, l'accumulation de PERICENTRINE au centrosome est diminuée (Knorz et al., 2010), même si aucune interaction directe n'est connue à l'heure actuelle entre ces deux protéines. De manière intéressante, Jurczyk *et al.* ont montré que la PERICENTRINE forme une complexe avec la POLYCYSTINE-2, une des protéine mutée dans la polykystose rénale et que l'inhibition par siARN de la PERICENTRINE perturbe la localisation au corps basal de la POLYCYSTINE-2 (Jurczyk et al., 2004). Une étude plus détaillée de ces protéines composant le matériel péri-centriolaire devra être réalisée dans nos cultures cellulaires et nous permettra de disséquer plus en détails les intervenants moléculaires de la surdité observée chez les patients ALMS.

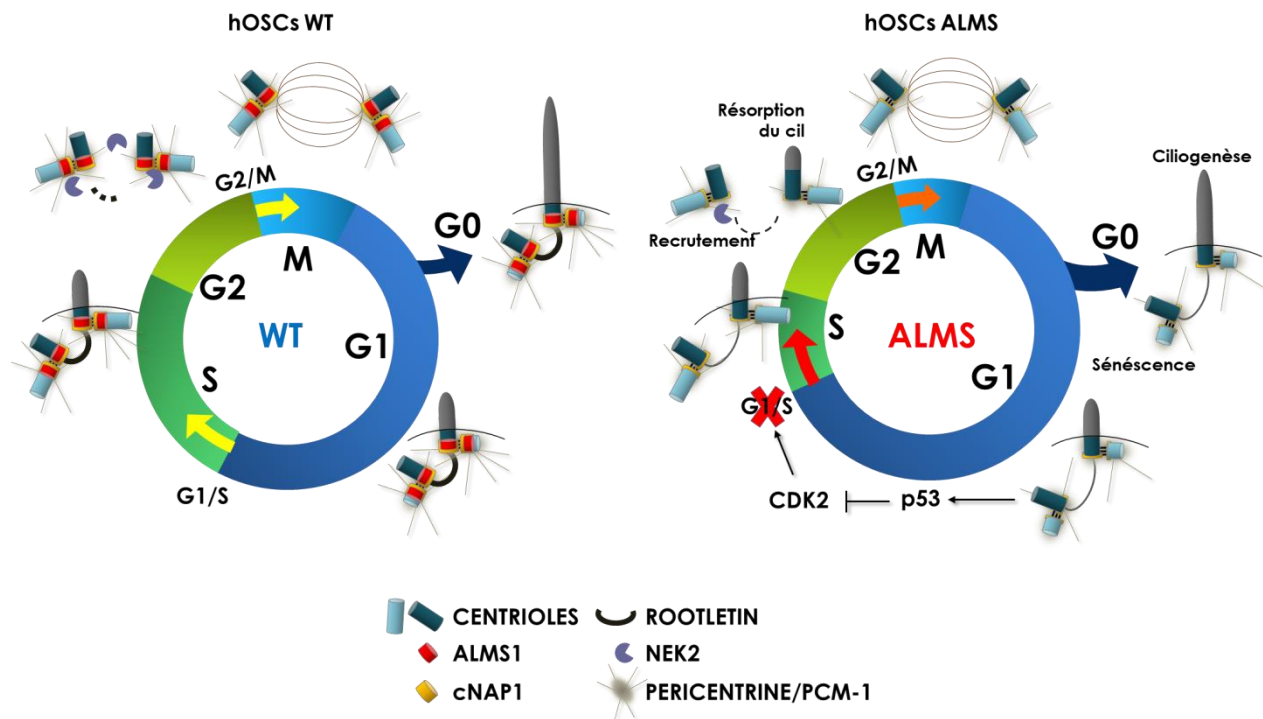


Figure 67: Perturbations du cycle cellulaire et de la ciliogenèse des hOSCs ALMS et hypothèses de travail. Suite à la mutation de la protéine ALMS1, les hOSCs mutées sont capables de bloquer leur cycle cellulaire en G1 via la voie p53-p21. L'activation de cette voie via une perte de cohésion centrosomale est associée à une sortie de cycle cellulaire et l'induction de la sénescence qui pourrait correspondre à la diminution de prolifération observée avec ces cellules. Cette diminution de prolifération des progéniteurs otiques engendrerait une diminution du nombre de cellules ciliées différenciées et permettrait d'expliquer la surdité juvénile des patients ALMS. De plus, les hOSCs mutées possèdent des défauts de ciliogenèse lorsqu'elles sont privées de facteurs de croissance. Une étude plus approfondie de ce processus en condition proliférative est nécessaire pour confirmer la diminution de ciliogenèse observée dans des lignées cellulaires invalidées pour ALMS1. Une diminution de ciliogenèse au stade progéniteur n'explique pas la surdité observée chez les patients mais pourrait refléter un problème de développement du cil une fois ces cellules différenciées en cellules ciliées. Cette hypothèse sera confirmée par la mise au point d'un protocole de différenciation terminale plus robuste.

7. Les cellules différenciées mutées pour ALMS1 semblent ré-entrer en cycle cellulaire

Enfin, nous avons observé une prolifération anormale des cellules mutées différenciées après 10 jours de co-culture. La nature des cellules proliférantes restent à déterminer mais tant les cellules ciliées que les cellules de soutien semblent affectées. En effet, l'analyse de coupes cochléaires provenant de patients sourd atteints du syndrome d'Alström (*post-mortem*), ont révélé un nombre anormalement élevé de cellules constituant l'organe de Corti (cellules de soutien et cellules ciliées) (Nadol et al., 2015). De même, Shenje *et al*, ont montré que les cardiomyocytes de patients ALMS, présentaient une prolifération anormale (Shenje et al., 2014). Des observations similaires ont été réalisées *in vitro*, à partir de culture de cellules rénales et cardiaques, invalidées

pour ALMS1 avec notamment une apparition de cellules cardiaques en phase G2/M (Li et al., 2007a; Shenje et al., 2014). Ceci suggère que les cellules différenciées mutées semblent capables de ré-entrer dans le cycle cellulaire. Nous étudierons l'apoptose de ces cellules car la réentrée dans le cycle cellulaire est associée la plus souvent à une mort par apoptose (Agah et al., 1997) (Folch et al., 2012). Une étude plus détaillée de ces cellules en prolifération est nécessaire pour connaître leur destin.

CONCLUSION

Conclusion

La protéine centrosomale ALMS1 est exprimée par toutes les cellules du corps humain expliquant pourquoi autant d'organes sont affectés suite à sa mutation dans le syndrome d'Alström. Nous nous sommes focalisés sur le développement cochléaire et la surdité développée chez les patients ALMS. Notre travail a permis la mise en place d'un modèle d'étude humain unique et la mise en évidence de phénotypes pathologiques complexes associés à la mutation de la protéine ALMS1.

Tout d'abord, sur base de la littérature disponible, nous avons mis au point un protocole de différenciation en cellules ciliées. L'ensemble de ces résultats confirment le rôle très important de la voie des FGFs lors de le développement cochléaire chez l'homme et montre le rôle primordial du FGF2 lors de l'induction otique. En effet, les cultures traitées avec HS et FGF2 ont montré un nombre significativement plus élevé de progéniteurs otiques. De plus, l'ajout d'une forte dose de FGF2, non seulement induit l'expression des marqueurs de progéniteurs otiques, mais inhibe le destin neurectodermique. Nous avons généré un pool homogène de ces progéniteurs otiques pour la première fois à partir de cellules hiPS. Ces hOSCs WT sont capables de se différencier en cellules ciliées organisées en rosettes otiques ATOH1 et MYO6 positives, en présence de cellules nourricières. La mise au point d'une méthode de différenciation plus robuste et plus efficace nous permettra l'étude de la ciliogenèse et de la fonctionnalité des cellules ciliées. Ainsi, le développement d'un protocole en 3D serait avantageux car cette méthode ne nécessite pas de tissu exogène et permettra de générer tous les types cellulaires de l'organe de Corti.

La génération des cellules hiPS à partir des patients sourds atteint du syndrome d'Alström constitue une source inépuisable de matériel humain unique disponible pour l'étude de cette ciliopathie. La génération des hiPS ALMS et leur différenciation en cellules progénitrices mutées nous a permis la mise en évidence de défauts de prolifération et de cycle cellulaire liés à la mutation de la protéine ALMS1. De manière importante, nous avons identifié les différentes phases du cycle cellulaire perturbées dans les cellules mutées. La diminution de cohésion des centrosomes suite à la mutation d'ALMS1 induit un retard de l'entrée en mitose dans les hiPS ALMS et un arrêt en G1 probablement associée à une sénescence dans les hOSCs ALMS. Ces

résultats sont en corrélation avec l'étude du cycle cellulaire d'autres types de cellules proliférantes déplétées pour ALMS1. Nous avons émis plusieurs hypothèses quant aux mécanismes moléculaires impliqués et aux conséquences de ces défauts complexes de cycle cellulaire dans lesquels cNAP1 et NEK2 jouerait un rôle central. Nous suggérons que la surdité précoce observée chez les patients ALMS serait due à une diminution de la prolifération des progéniteurs otiques mutés. En plus, ces progéniteurs produisent un cil primaire anormalement court, caractéristique des phénotypes observés dans les ciliopathies. Une étude plus détaillée de l'implication des protéines centrosomales telles que la PERICENTRINE et d'autres protéines impliquées dans la ciliogenèse nous permettra de disséquer les mécanismes moléculaires qui sous-tendent la surdité chez les patients ALMS. De manière importante, nous observons une prolifération anormale des cellules différenciées même si leur identité reste à démontrer. Ceci suggère que les cellules ciliées correctement différenciées à partir du pool réduit de progéniteurs otiques ré-entrent en cycle cellulaire puis dégénèrent. Cependant, la mise au point d'un protocole de différenciation terminale plus robuste permettant la différenciation terminale de ces progéniteurs en cellules cochléaires de manière plus efficace, nous permettra à terme, l'étude de la maladie à ce stade de développement plus avancé.

Par l'étude du modèle humain de surdité, nous sommes en mesure de confirmer différents phénotypes observés chez les patients ALMS. Une amélioration de ce modèle et une étude plus approfondie des intervenants moléculaires nous permettra une meilleure compréhension de la physiopathologie complexe du syndrome d'Alström.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Adato, A., G. Lefevre, B. Delprat, V. Michel, N. Michalski, S. Chardenoux, D. Weil, A. El-Amraoui, and C. Petit. 2005. Usherin, the defective protein in Usher syndrome type IIA, is likely to be a component of interstereocilia ankle links in the inner ear sensory cells. *Human molecular genetics*. 14:3921-3932.
- Agah, R., L.A. Kirshenbaum, M. Abdellatif, L.D. Truong, S. Chakraborty, L.H. Michael, and M.D. Schneider. 1997. Adenoviral delivery of E2F-1 directs cell cycle reentry and p53-independent apoptosis in postmitotic adult myocardium in vivo. *The Journal of clinical investigation*. 100:2722-2728.
- Alsina, B., G. Abello, E. Ulloa, D. Henrique, C. Pujades, and F. Giraldez. 2004. FGF signaling is required for determination of otic neuroblasts in the chick embryo. *Developmental biology*. 267:119-134.
- Alstrom, C.H., B. Hallgren, L.B. Nilsson, and H. Asander. 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 psychiatrica et neurologica Scandinavica. Supplementum*. 129:1-35.
- Amit, M., M.K. Carpenter, M.S. Inokuma, C.P. Chiu, C.P. Harris, M.A. Waknitz, J. Itskovitz-Eldor, and J.A. Thomson. 2000. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Developmental biology*. 227:271-278.
- Andersen, J.S., C.J. Wilkinson, T. Mayor, P. Mortensen, E.A. Nigg, and M. Mann. 2003. Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature*. 426:570-574.
- Anniko, M. 1983. Cytodifferentiation of cochlear hair cells. *Am. J. Otolaryngol*. 4:375-388.
- Ansley, S.J., J.L. Badano, O.E. Blacque, J. Hill, B.E. Hoskins, C.C. Leitch, J.C. Kim, A.J. Ross, E.R. Eichers, T.M. Teslovich, A.K. Mah, R.C. Johnsen, J.C. Cavender, R.A. Lewis, M.R. Leroux, P.L. Beales, and N. Katsanis. 2003. Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome. *Nature*. 425:628-633.
- Aoi, T., K. Yae, M. Nakagawa, T. Ichisaka, K. Okita, K. Takahashi, T. Chiba, and S. Yamanaka. 2008. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science (New York, N.Y.)*. 321:699-702.
- Appler, J.M., and L.V. Goodrich. 2011. Connecting the ear to the brain: Molecular mechanisms of auditory circuit assembly. *Progress in neurobiology*. 93:488-508.
- Arnold, K., A. Sarkar, M.A. Yram, J.M. Polo, R. Bronson, S. Sengupta, M. Seandel, N. Geijsen, and K. Hochedlinger. 2011. Sox2(+) adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice. *Cell stem cell*. 9:317-329.
- Arsov, T., D.G. Silva, M.K. O'Bryan, A. Sainsbury, N.J. Lee, C. Kennedy, S.S. Manji, K. Nelms, C. Liu, C.G. Vinuesa, D.M. de Kretser, C.C. Goodnow, and N. Petrovsky. 2006. Fat aussie--a new Alstrom syndrome mouse showing a critical role for ALMS1 in obesity, diabetes, and spermatogenesis. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*. 20:1610-1622.
- Avilion, A.A., S.K. Nicolis, L.H. Pevny, L. Perez, N. Vivian, and R. Lovell-Badge. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & development*. 17:126-140.

- Avner, P., and E. Heard. 2001. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nature reviews. Genetics.* 2:59-67.
- Axelrod, J.D. 2008. Bad hair days for mouse PCP mutants. *Nature cell biology.* 10:1251-1253.
- Azimzadeh, J., and M. Bornens. 2007. Structure and duplication of the centrosome. *Journal of cell science.* 120:2139-2142.
- Badano, J.L., N. Mitsuma, P.L. Beales, and N. Katsanis. 2006. The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annual review of genomics and human genetics.* 7:125-148.
- Bahe, S., Y.D. Stierhof, C.J. Wilkinson, F. Leiss, and E.A. Nigg. 2005. Rootletin forms centriole-associated filaments and functions in centrosome cohesion. *The Journal of cell biology.* 171:27-33.
- Bailey, A.P., and A. Streit. 2006. Sensory organs: making and breaking the pre-placodal region. *Current topics in developmental biology.* 72:167-204.
- Baker, C.V., M.R. Stark, C. Marcelle, and M. Bronner-Fraser. 1999. Competence, specification and induction of Pax-3 in the trigeminal placode. *Development.* 126:147-156.
- Baker, M. 2007. Stem cells by any other name. *Nature.* 449:389.
- Bar-Nur, O., H.A. Russ, S. Efrat, and N. Benvenisty. 2011. Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. *Cell stem cell.* 9:17-23.
- Bar, M., S.K. Wyman, B.R. Fritz, J. Qi, K.S. Garg, R.K. Parkin, E.M. Kroh, A. Bendoraite, P.S. Mitchell, A.M. Nelson, W.L. Ruzzo, C. Ware, J.P. Radich, R. Gentleman, H. Ruohola-Baker, and M. Tewari. 2008. MicroRNA discovery and profiling in human embryonic stem cells by deep sequencing of small RNA libraries. *Stem cells (Dayton, Ohio).* 26:2496-2505.
- Barrenas, M.L., A. Bratthall, and J. Dahlgren. 2005. The association between short stature and sensorineural hearing loss. *Hearing research.* 205:123-130.
- Barta, T., V. Vinarsky, Z. Holubcova, D. Dolezalova, J. Verner, S. Pospisilova, P. Dvorak, and A. Hampl. 2010. Human embryonic stem cells are capable of executing G1/S checkpoint activation. *Stem cells (Dayton, Ohio).* 28:1143-1152.
- Bartek, J., and J. Lukas. 2001a. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Current opinion in cell biology.* 13:738-747.
- Bartek, J., and J. Lukas. 2001b. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS letters.* 490:117-122.
- Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 116:281-297.
- Becker, K.A., P.N. Ghule, J.A. Therrien, J.B. Lian, J.L. Stein, A.J. van Wijnen, and G.S. Stein. 2006. Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase. *Journal of cellular physiology.* 209:883-893.
- Becker, K.A., J.L. Stein, J.B. Lian, A.J. van Wijnen, and G.S. Stein. 2010. Human embryonic stem cells are pre-mitotically committed to self-renewal and acquire a lengthened G1 phase upon lineage programming. *Journal of cellular physiology.* 222:103-110.
- Beddington, R.S., and E.J. Robertson. 1999. Axis development and early asymmetry in mammals. *Cell.* 96:195-209.
- Ben-David, U., N. Benvenisty, and Y. Mayshar. 2010. Genetic instability in human induced pluripotent stem cells: classification of causes and possible safeguards. *Cell cycle (Georgetown, Tex.).* 9:4603-4604.

- Bendall, S.C., M.H. Stewart, P. Menendez, D. George, K. Vijayaragavan, T. Werbowetski-Ogilvie, V. Ramos-Mejia, A. Rouleau, J. Yang, M. Bosse, G. Lajoie, and M. Bhatia. 2007. IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro. *Nature*. 448:1015-1021.
- Berger, M.F., G. Badis, A.R. Gehrke, S. Talukder, A.A. Philippakis, L. Pena-Castillo, T.M. Alleyne, S. Mnaimneh, O.B. Botvinnik, E.T. Chan, F. Khalid, W. Zhang, D. Newburger, S.A. Jaeger, Q.D. Morris, M.L. Bulyk, and T.R. Hughes. 2008. Variation in homeodomain DNA binding revealed by high-resolution analysis of sequence preferences. *Cell*. 133:1266-1276.
- Bermingham, N.A. 1999. Math1: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science (New York, N.Y.)*. 284:1837-1841.
- Bettencourt-Dias, M., and Z. Carvalho-Santos. 2008. Double life of centrioles: CP110 in the spotlight. *Trends in cell biology*. 18:8-11.
- Bhattacharyya, S., and M. Bronner-Fraser. 2008. Competence, specification and commitment to an olfactory placode fate. *Development*. 135:4165-4177.
- Bhutani, N., J.J. Brady, M. Damian, A. Sacco, S.Y. Corbel, and H.M. Blau. 2010. Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature*. 463:1042-1047.
- Bianchi, L.M., A.L. Person, and E.B. Penney. 2002. Embryonic inner ear cells reaggregate into specific patterns in vitro. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO*. 3:418-429.
- Bibas, A., R. Hornigold, J. Liang, L. Michaels, S. Anagnostopoulou, and A. Wright. 2006. The development of the spiral ganglion in the human foetus. *Folia morphologica*. 65:140-144.
- Bibas, A.G., J. Xenellis, L. Michaels, S. Anagnostopoulou, E. Ferekidis, and A. Wright. 2008. Temporal bone study of development of the organ of Corti: correlation between auditory function and anatomical structure. *The Journal of laryngology and otology*. 122:336-342.
- Bock, C., E. Kiskinis, G. Verstappen, H. Gu, G. Boulting, Z.D. Smith, M. Ziller, G.F. Croft, M.W. Amoroso, D.H. Oakley, A. Gnirke, K. Eggan, and A. Meissner. 2011. Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell*. 144:439-452.
- Bogdanove, A.J., and D.F. Voytas. 2011. TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science (New York, N.Y.)*. 333:1843-1846.
- Boland, M.J., J.L. Hazen, K.L. Nazor, A.R. Rodriguez, W. Gifford, G. Martin, S. Kupriyanov, and K.K. Baldwin. 2009. Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature*. 461:91-94.
- Bonnet, C., and A. El-Amraoui. 2012. Usher syndrome (sensorineural deafness and retinitis pigmentosa): pathogenesis, molecular diagnosis and therapeutic approaches. *Current opinion in neurology*. 25:42-49.
- Booth, D.G., M. Takagi, L. Sanchez-Pulido, E. Petfalski, G. Vargiu, K. Samejima, N. Imamoto, C.P. Ponting, D. Tollervey, W.C. Earnshaw, and P. Vagnarelli. 2014. Ki-67 is a PP1-interacting protein that organises the mitotic chromosome periphery. *eLife*. 3:e01641.
- Boulting, G.L., E. Kiskinis, G.F. Croft, M.W. Amoroso, D.H. Oakley, B.J. Wainger, D.J. Williams, D.J. Kahler, M. Yamaki, L. Davidow, C.T. Rodolfa, J.T. Dimos, S. Mikkilineni, A.B. MacDermott, C.J. Woolf, C.E. Henderson, H. Wichterle, and K. Eggan. 2011. A functionally characterized test set of human induced pluripotent stem cells. *Nature biotechnology*. 29:279-286.

- Boyer, L.A., D. Mathur, and R. Jaenisch. 2006. Molecular control of pluripotency. *Current opinion in genetics & development*. 16:455-462.
- Braam, S.R., L. Tertoolen, S. Casini, E. Matsa, H.R. Lu, A. Teisman, R. Passier, C. Denning, D.J. Gallacher, R. Towart, and C.L. Mummery. 2013. Repolarization reserve determines drug responses in human pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. *Stem cell research*. 10:48-56.
- Brambrink, T., R. Foreman, G.G. Welstead, C.J. Lengner, M. Wernig, H. Suh, and R. Jaenisch. 2008. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell stem cell*. 2:151-159.
- Brennan, K.J., A. Simone, J. Jou, C. Gelboin-Burkhardt, N. Tran, S. Sangar, Y. Li, Y. Mu, G. Chen, D. Yu, S. McCarthy, J. Sebat, and F.H. Gage. 2011. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*. 473:221-225.
- Brons, I.G., L.E. Smithers, M.W. Trotter, P. Rugg-Gunn, B. Sun, S.M. Chuva de Sousa Lopes, S.K. Howlett, A. Clarkson, L. Ahrlund-Richter, R.A. Pedersen, and L. Vallier. 2007. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*. 448:191-195.
- Brown, S., A. Teo, S. Pauklin, N. Hannan, C.H. Cho, B. Lim, L. Vardy, N.R. Dunn, M. Trotter, R. Pedersen, and L. Vallier. 2011. Activin/Nodal signaling controls divergent transcriptional networks in human embryonic stem cells and in endoderm progenitors. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 29:1176-1185.
- Buganim, Y., D.A. Faddah, A.W. Cheng, E. Itskovich, S. Markoulaki, K. Ganz, S.L. Klemm, A. van Oudenaarden, and R. Jaenisch. 2012. Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase. *Cell*. 150:1209-1222.
- Burridge, K., and K. Wennerberg. 2004. Rho and Rac take center stage. *Cell*. 116:167-179.
- Buttitta, L.A., A.J. Katzaroff, C.L. Perez, A. de la Cruz, and B.A. Edgar. 2007. A double-assurance mechanism controls cell cycle exit upon terminal differentiation in *Drosophila*. *Developmental cell*. 12:631-643.
- Byrne, S.M., P. Mali, and G.M. Church. 2014. Genome editing in human stem cells. *Methods in enzymology*. 546:119-138.
- Cai, L., Z. Ye, B.Y. Zhou, P. Mali, C. Zhou, and L. Cheng. 2007. Promoting human embryonic stem cell renewal or differentiation by modulating Wnt signal and culture conditions. *Cell research*. 17:62-72.
- Camarero, G., C. Avendano, C. Fernandez-Moreno, A. Villar, J. Contreras, F. de Pablo, J.G. Pichel, and I. Varela-Nieto. 2001. Delayed inner ear maturation and neuronal loss in postnatal Igf-1-deficient mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 21:7630-7641.
- Camarero, G., Y. Leon, I. Gorospe, F. De Pablo, B. Alsina, F. Giraldez, and I. Varela-Nieto. 2003. Insulin-like growth factor 1 is required for survival of transit-amplifying neuroblasts and differentiation of otic neurons. *Developmental biology*. 262:242-253.
- Cantone, I., and A.G. Fisher. 2013. Epigenetic programming and reprogramming during development. *Nature structural & molecular biology*. 20:282-289.
- Cardenas-Rodriguez, M., and J.L. Badano. 2009. Ciliary biology: understanding the cellular and genetic basis of human ciliopathies. *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics*. 151C:263-280.
- Carpenter, L., C. Carr, C.T. Yang, D.J. Stuckey, K. Clarke, and S.M. Watt. 2012. Efficient differentiation of human induced pluripotent stem cells generates cardiac cells that

- provide protection following myocardial infarction in the rat. *Stem cells and development*. 21:977-986.
- Carroll, D. 2013. Staying on target with CRISPR-Cas. *Nature biotechnology*. 31:807-809.
- Chambers, I., D. Colby, M. Robertson, J. Nichols, S. Lee, S. Tweedie, and A. Smith. 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 113:643-655.
- Chambers, S.M., C.A. Fasano, E.P. Papapetrou, M. Tomishima, M. Sadelain, and L. Studer. 2009. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nature biotechnology*. 27:275-280.
- Charras, G., and E. Paluch. 2008. Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 9:730-736.
- Chen, J., and A. Streit. 2013. Induction of the inner ear: stepwise specification of otic fate from multipotent progenitors. *Hearing research*. 297:3-12.
- Chen, K.G., B.S. Mallon, R.D. McKay, and P.G. Robey. 2014. Human pluripotent stem cell culture: considerations for maintenance, expansion, and therapeutics. *Cell stem cell*. 14:13-26.
- Chen, P., and N. Segil. 1999. p27(Kip1) links cell proliferation to morphogenesis in the developing organ of Corti. *Development*. 126:1581-1590.
- Chen, W., S.L. Johnson, W. Marcotti, P.W. Andrews, H.D. Moore, and M.N. Rivolta. 2009. Human fetal auditory stem cells can be expanded in vitro and differentiate into functional auditory neurons and hair cell-like cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 27:1196-1204.
- Chen, W., N. Jongkamonwiwat, L. Abbas, S.J. Eshtan, S.L. Johnson, S. Kuhn, M. Milo, J.K. Thurlow, P.W. Andrews, W. Marcotti, H.D. Moore, and M.N. Rivolta. 2012. Restoration of auditory evoked responses by human ES-cell-derived otic progenitors. *Nature*. 490:278-282.
- Chen, X., H. Xu, P. Yuan, F. Fang, M. Huss, V.B. Vega, E. Wong, Y.L. Orlov, W. Zhang, J. Jiang, Y.H. Loh, H.C. Yeo, Z.X. Yeo, V. Narang, K.R. Govindarajan, B. Leong, A. Shahab, Y. Ruan, G. Bourque, W.K. Sung, N.D. Clarke, C.L. Wei, and H.H. Ng. 2008. Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell*. 133:1106-1117.
- Chen, Y., J. Cao, M. Xiong, A.J. Petersen, Y. Dong, Y. Tao, C.T. Huang, Z. Du, and S.C. Zhang. 2015. Engineering Human Stem Cell Lines with Inducible Gene Knockout using CRISPR/Cas9. *Cell stem cell*. 17:233-244.
- Cho, M.S., Y.E. Lee, J.Y. Kim, S. Chung, Y.H. Cho, D.S. Kim, S.M. Kang, H. Lee, M.H. Kim, J.H. Kim, J.W. Leem, S.K. Oh, Y.M. Choi, D.Y. Hwang, J.W. Chang, and D.W. Kim. 2008. Highly efficient and large-scale generation of functional dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:3392-3397.
- Cho, S.W., S. Kim, J.M. Kim, and J.S. Kim. 2013. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature biotechnology*. 31:230-232.
- Christensen, S.T., C.A. Clement, P. Satir, and L.B. Pedersen. 2012. Primary cilia and coordination of receptor tyrosine kinase (RTK) signalling. *The Journal of pathology*. 226:172-184.
- Christensen, S.T., S.F. Pedersen, P. Satir, I.R. Veland, and L. Schneider. 2008. The primary cilium coordinates signaling pathways in cell cycle control and migration during development and tissue repair. *Current topics in developmental biology*. 85:261-301.

- Christian, M., T. Cermak, E.L. Doyle, C. Schmidt, F. Zhang, A. Hummel, A.J. Bogdanove, and D.F. Voytas. 2010. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*. 186:757-761.
- Christophorou, N.A., M. Mende, L. Lleras-Forero, T. Grocott, and A. Streit. 2010. Pax2 coordinates epithelial morphogenesis and cell fate in the inner ear. *Developmental biology*. 345:180-190.
- Citton, V., A. Favaro, V. Bettini, J. Gabrieli, G. Milan, N.A. Greggio, J.D. Marshall, J.K. Naggert, R. Manara, and P. Maffei. 2013. Brain involvement in Alstrom syndrome. *Orphanet journal of rare diseases*. 8:24.
- Collado, M.S., B.R. Thiede, W. Baker, C. Askew, L.M. Igbani, and J.T. Corwin. 2011. The postnatal accumulation of junctional E-cadherin is inversely correlated with the capacity for supporting cells to convert directly into sensory hair cells in mammalian balance organs. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 31:11855-11866.
- Collin, G.B., E. Cyr, R. Bronson, J.D. Marshall, E.J. Gifford, W. Hicks, S.A. Murray, Q.Y. Zheng, R.S. Smith, P.M. Nishina, and J.K. Naggert. 2005. Alms1-disrupted mice recapitulate human Alstrom syndrome. *Human molecular genetics*. 14:2323-2333.
- Collin, G.B., J.D. Marshall, A. Ikeda, W.V. So, I. Russell-Eggitt, P. Maffei, S. Beck, C.F. Boerkoel, N. Siculo, M. Martin, P.M. Nishina, and J.K. Naggert. 2002. Mutations in ALMS1 cause obesity, type 2 diabetes and neurosensory degeneration in Alstrom syndrome. *Nature genetics*. 31:74-78.
- Collin, G.B., J.D. Marshall, B.L. King, G. Milan, P. Maffei, D.J. Jagger, and J.K. Naggert. 2012. The Alstrom syndrome protein, ALMS1, interacts with alpha-actinin and components of the endosome recycling pathway. *PloS one*. 7:e37925.
- Cong, L., F.A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P.D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L.A. Marraffini, and F. Zhang. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science (New York, N.Y.)*. 339:819-823.
- Costa, A., L. Sanchez-Guardado, S. Juniata, J.E. Gale, N. Daudet, and D. Henrique. 2015. Generation of sensory hair cells by genetic programming with a combination of transcription factors. *Development*. 142:1948-1959.
- Counter, C.M., A.A. Avilion, C.E. LeFeuvre, N.G. Stewart, C.W. Greider, C.B. Harley, and S. Bacchetti. 1992. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *The EMBO journal*. 11:1921-1929.
- Coutu, D.L., and J. Galipeau. 2011. Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging. *Aging*. 3:920-933.
- Cowan, C.A., I. Klimanskaya, J. McMahon, J. Atienza, J. Witmyer, J.P. Zucker, S. Wang, C.C. Morton, A.P. McMahon, D. Powers, and D.A. Melton. 2004. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *The New England journal of medicine*. 350:1353-1356.
- Cyranoski, D. 2013. Stem cells cruise to clinic. *Nature*. 494:413.
- Dabdoub, A., C. Puligilla, J.M. Jones, B. Fritzsich, K.S. Cheah, L.H. Pevny, and M.W. Kelley. 2008. Sox2 signaling in prosensory domain specification and subsequent hair cell differentiation in the developing cochlea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:18396-18401.
- Dambrot, C., R. Passier, D. Atsma, and C.L. Mummery. 2011. Cardiomyocyte differentiation of pluripotent stem cells and their use as cardiac disease models. *The Biochemical journal*. 434:25-35.

- Dammermann, A., and A. Merdes. 2002. Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. *The Journal of cell biology*. 159:255-266.
- Darr, H., and N. Benvenisty. 2006. Factors involved in self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Handbook of experimental pharmacology*:1-19.
- David, L., and J.M. Polo. 2014. Phases of reprogramming. *Stem cell research*. 12:754-761.
- Dawe, H.R., H. Farr, and K. Gull. 2007. Centriole/basal body morphogenesis and migration during ciliogenesis in animal cells. *Journal of cell science*. 120:7-15.
- De Paepe, C., M. Krivega, G. Cauffman, M. Geens, and H. Van de Velde. 2014. Totipotency and lineage segregation in the human embryo. *Molecular human reproduction*. 20:599-618.
- Delaval, B., and S.J. Doxsey. 2010. Pericentrin in cellular function and disease. *The Journal of cell biology*. 188:181-190.
- Denny, P., S. Swift, F. Connor, and A. Ashworth. 1992. An SRY-related gene expressed during spermatogenesis in the mouse encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *The EMBO journal*. 11:3705-3712.
- Dimos, J.T., K.T. Rodolfa, K.K. Niakan, L.M. Weisenthal, H. Mitumoto, W. Chung, G.F. Croft, G. Saphier, R. Leibel, R. Goland, H. Wichterle, C.E. Henderson, and K. Eggan. 2008. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science (New York, N.Y.)*. 321:1218-1221.
- Dimri, G.P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E.E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj, O. Pereira-Smith, and et al. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92:9363-9367.
- DiPaola, R.S. 2002. To arrest or not to G(2)-M Cell-cycle arrest : commentary re: A. K. Tyagi et al., Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth inhibition, G(2)-M arrest, and apoptosis. *Clin. cancer res.*, 8: 3512-3519, 2002. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 8:3311-3314.
- Doetzlhofer, A., M.L. Basch, T. Ohyama, M. Gessler, A.K. Groves, and N. Segil. 2009. Hey2 regulation by FGF provides a Notch-independent mechanism for maintaining pillar cell fate in the organ of Corti. *Developmental cell*. 16:58-69.
- Doetzlhofer, A., P. White, Y.S. Lee, A. Groves, and N. Segil. 2006. Prospective identification and purification of hair cell and supporting cell progenitors from the embryonic cochlea. *Brain research*. 1091:282-288.
- Doetzlhofer, A., P.M. White, J.E. Johnson, N. Segil, and A.K. Groves. 2004. In vitro growth and differentiation of mammalian sensory hair cell progenitors: a requirement for EGF and periotic mesenchyme. *Developmental biology*. 272:432-447.
- Doxsey, S., W. Zimmerman, and K. Mikule. 2005. Centrosome control of the cell cycle. *Trends in cell biology*. 15:303-311.
- Draper, J.S., K. Smith, P. Gokhale, H.D. Moore, E. Maltby, J. Johnson, L. Meisner, T.P. Zwaka, J.A. Thomson, and P.W. Andrews. 2004. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*. 22:53-54.
- Dravid, G., Z. Ye, H. Hammond, G. Chen, A. Pyle, P. Donovan, X. Yu, and L. Cheng. 2005. Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 23:1489-1501.
- Ebert, A.D., J. Yu, F.F. Rose, Jr., V.B. Mattis, C.L. Lorson, J.A. Thomson, and C.N. Svendsen. 2009. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*. 457:277-280.

- Eguren, M., E. Porlan, E. Manchado, I. Garcia-Higuera, M. Canamero, I. Farinas, and M. Malumbres. 2013. The APC/C cofactor Cdh1 prevents replicative stress and p53-dependent cell death in neural progenitors. *Nature communications*. 4:2880.
- Eiraku, M., N. Takata, H. Ishibashi, M. Kawada, E. Sakakura, S. Okuda, K. Sekiguchi, T. Adachi, and Y. Sasai. 2011. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature*. 472:51-56.
- Eiraku, M., K. Watanabe, M. Matsuo-Takasaki, M. Kawada, S. Yonemura, M. Matsumura, T. Wataya, A. Nishiyama, K. Muguruma, and Y. Sasai. 2008. Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell stem cell*. 3:519-532.
- Elenius, K., and M. Jalkanen. 1994. Function of the syndecans--a family of cell surface proteoglycans. *Journal of cell science*. 107 (Pt 11):2975-2982.
- Elkabetz, Y., G. Panagiotakos, G. Al Shamy, N.D. Socci, V. Tabar, and L. Studer. 2008. Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes & development*. 22:152-165.
- Esteban, M.A., T. Wang, B. Qin, J. Yang, D. Qin, J. Cai, W. Li, Z. Weng, J. Chen, S. Ni, K. Chen, Y. Li, X. Liu, J. Xu, S. Zhang, F. Li, W. He, K. Labuda, Y. Song, A. Peterbauer, S. Wolbank, H. Redl, M. Zhong, D. Cai, L. Zeng, and D. Pei. 2010. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell*. 6:71-79.
- Evans, M.J., and M.H. Kaufman. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 292:154-156.
- Fan, Y., P. Rahman, L. Peddle, D. Hefferton, N. Gladney, S.J. Moore, J.S. Green, P.S. Parfrey, and W.S. Davidson. 2004. Bardet-Biedl syndrome 1 genotype and obesity in the Newfoundland population. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity*. 28:680-684.
- Fekete, D.M., S. Muthukumar, and D. Karagogeos. 1998. Hair cells and supporting cells share a common progenitor in the avian inner ear. *J. Neurosci*. 18:7811-7821.
- Ferguson-Smith, A.C., and M.A. Surani. 2001. Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. *Science (New York, N.Y.)*. 293:1086-1089.
- Ferri, A.L., M. Cavallaro, D. Braidà, A. Di Cristofano, A. Canta, A. Vezzani, S. Ottolenghi, P.P. Pandolfi, M. Sala, S. DeBiasi, and S.K. Nicolis. 2004. Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development*. 131:3805-3819.
- Firth, A.L., T. Menon, G.S. Parker, S.J. Qualls, B.M. Lewis, E. Ke, C.T. Dargitz, R. Wright, A. Khanna, F.H. Gage, and I.M. Verma. 2015. Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs. *Cell reports*. 12:1385-1390.
- Folch, J., F. Junyent, E. Verdaguer, C. Auladell, J.G. Pizarro, C. Beas-Zarate, M. Pallas, and A. Camins. 2012. Role of cell cycle re-entry in neurons: a common apoptotic mechanism of neuronal cell death. *Neurotoxicity research*. 22:195-207.
- Fong, H., K.A. Hohenstein, and P.J. Donovan. 2008. Regulation of self-renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 26:1931-1938.
- Forsythe, E., and P.L. Beales. 2013. Bardet-Biedl syndrome. *European journal of human genetics : EJHG*. 21:8-13.
- Freter, S., Y. Muta, S.S. Mak, S. Rinkwitz, and R.K. Ladher. 2008. Progressive restriction of otic fate: the role of FGF and Wnt in resolving inner ear potential. *Development*. 135:3415-3424.

- Freter, S., Y. Muta, P. O'Neill, V.S. Vassilev, S. Kuraku, and R.K. Ladher. 2012. Pax2 modulates proliferation during specification of the otic and epibranchial placodes. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 241:1716-1728.
- Fry, A.M., P. Meraldi, and E.A. Nigg. 1998. A centrosomal function for the human Nek2 protein kinase, a member of the NIMA family of cell cycle regulators. *The EMBO journal*. 17:470-481.
- Fu, Y., J.A. Foden, C. Khayter, M.L. Maeder, D. Reyon, J.K. Joung, and J.D. Sander. 2013. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature biotechnology*. 31:822-826.
- Fusaki, N., H. Ban, A. Nishiyama, K. Saeki, and M. Hasegawa. 2009. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*. 85:348-362.
- Gafni, O., L. Weinberger, A.A. Mansour, Y.S. Manor, E. Chomsky, D. Ben-Yosef, Y. Kalma, S. Viukov, I. Maza, A. Zviran, Y. Rais, Z. Shipony, Z. Mukamel, V. Krupalnik, M. Zerbib, S. Geula, I. Caspi, D. Schneir, T. Schwartz, S. Gilad, D. Amann-Zalcenstein, S. Benjamin, I. Amit, A. Tanay, R. Massarwa, N. Novershtern, and J.H. Hanna. 2013. Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature*. 504:282-286.
- Gagliardi, A., N.P. Mullin, Z. Ying Tan, D. Colby, A.I. Kousa, F. Halbritter, J.T. Weiss, A. Felker, K. Bezstarosti, R. Favaro, J. Demmers, S.K. Nicolis, S.R. Tomlinson, R.A. Poot, and I. Chambers. 2013. A direct physical interaction between Nanog and Sox2 regulates embryonic stem cell self-renewal. *The EMBO journal*. 32:2231-2247.
- Gale, J.E., W. Marcotti, H.J. Kennedy, C.J. Kros, and G.P. Richardson. 2001. FM1-43 dye behaves as a permeant blocker of the hair-cell mechanotransducer channel. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 21:7013-7025.
- Gehring, W.J., Y.Q. Qian, M. Billeter, K. Furukubo-Tokunaga, A.F. Schier, D. Resendez-Perez, M. Affolter, G. Otting, and K. Wuthrich. 1994. Homeodomain-DNA recognition. *Cell*. 78:211-223.
- Girard, D., and N. Petrovsky. 2011. Alstrom syndrome: insights into the pathogenesis of metabolic disorders. *Nature reviews. Endocrinology*. 7:77-88.
- Golipour, A., L. David, Y. Liu, G. Jayakumaran, C.L. Hirsch, D. Trcka, and J.L. Wrana. 2012. A late transition in somatic cell reprogramming requires regulators distinct from the pluripotency network. *Cell stem cell*. 11:769-782.
- Gordon, P.H., D.H. Moore, R.G. Miller, J.M. Florence, J.L. Verheijde, C. Doorish, J.F. Hilton, G.M. Spitalny, R.B. MacArthur, H. Mitsumoto, H.E. Neville, K. Boylan, T. Mozaffar, J.M. Belsh, J. Ravits, R.S. Bedlack, M.C. Graves, L.F. McCluskey, R.J. Barohn, and R. Tandan. 2007. Efficacy of minocycline in patients with amyotrophic lateral sclerosis: a phase III randomised trial. *Lancet neurology*. 6:1045-1053.
- Gottardi, C.J., E. Wong, and B.M. Gumbiner. 2001. E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *The Journal of cell biology*. 153:1049-1060.
- Graser, S., Y.D. Stierhof, S.B. Lavoie, O.S. Gassner, S. Lamla, M. Le Clech, and E.A. Nigg. 2007. Cep164, a novel centriole appendage protein required for primary cilium formation. *The Journal of cell biology*. 179:321-330.

- Greber, B., H. Lehrach, and J. Adjaye. 2007. Fibroblast growth factor 2 modulates transforming growth factor beta signaling in mouse embryonic fibroblasts and human ESCs (hESCs) to support hESC self-renewal. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 25:455-464.
- Greber, B., G. Wu, C. Bernemann, J.Y. Joo, D.W. Han, K. Ko, N. Tapia, D. Sabour, J. Sternecker, P. Tesar, and H.R. Scholer. 2010. Conserved and divergent roles of FGF signaling in mouse epiblast stem cells and human embryonic stem cells. *Cell stem cell*. 6:215-226.
- Grobarczyk, B., B. Franco, K. Hanon, and B. Malgrange. 2015. Generation of Isogenic Human iPS Cell Line Precisely Corrected by Genome Editing Using the CRISPR/Cas9 System. *Stem cell reviews*. 11:774-787.
- Groves, A.K., and M. Bronner-Fraser. 2000. Competence, specification and commitment in otic placode induction. *Development*. 127:3489-3499.
- Groves, A.K., and D.M. Fekete. 2012. Shaping sound in space: the regulation of inner ear patterning. *Development*. 139:245-257.
- Groves, A.K., and C. LaBonne. 2014. Setting appropriate boundaries: fate, patterning and competence at the neural plate border. *Developmental biology*. 389:2-12.
- Gunewardene, N., N.V. Bergen, D. Crombie, K. Needham, M. Dottori, and B.A. Nayagam. 2014. Directing human induced pluripotent stem cells into a neurosensory lineage for auditory neuron replacement. *BioResearch open access*. 3:162-175.
- Gurdon, J.B. 1962. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *Journal of embryology and experimental morphology*. 10:622-640.
- Gurtler, N., Y. Kim, A. Mhatre, R. Muller, R. Probst, and A.K. Lalwani. 2003. GJB2 mutations in the Swiss hearing impaired. *Ear and hearing*. 24:440-447.
- Hammond, K.L., and T.T. Whitfield. 2011. Fgf and Hh signalling act on a symmetrical pre-pattern to specify anterior and posterior identity in the zebrafish otic placode and vesicle. *Development*. 138:3977-3987.
- Hanna, J., K. Saha, B. Pando, J. van Zon, C.J. Lengner, M.P. Creighton, A. van Oudenaarden, and R. Jaenisch. 2009. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature*. 462:595-601.
- Hanna, J., M. Wernig, S. Markoulaki, C.W. Sun, A. Meissner, J.P. Cassady, C. Beard, T. Brambrink, L.C. Wu, T.M. Townes, and R. Jaenisch. 2007. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science (New York, N.Y.)*. 318:1920-1923.
- Hans, S., D. Liu, and M. Westerfield. 2004. Pax8 and Pax2a function synergistically in otic specification, downstream of the Foxl1 and Dlx3b transcription factors. *Development*. 131:5091-5102.
- Hansson, J., M.R. Rafiee, S. Reiland, J.M. Polo, J. Gehring, S. Okawa, W. Huber, K. Hochedlinger, and J. Krijgsveld. 2012. Highly coordinated proteome dynamics during reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell reports*. 2:1579-1592.
- Harb, N., T.K. Archer, and N. Sato. 2008. The Rho-Rock-Myosin signaling axis determines cell-cell integrity of self-renewing pluripotent stem cells. *PloS one*. 3:e3001.
- Hargus, G., O. Cooper, M. Deleidi, A. Levy, K. Lee, E. Marlow, A. Yow, F. Soldner, D. Hockemeyer, P.J. Hallett, T. Osborn, R. Jaenisch, and O. Isacson. 2010. Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:15921-15926.

- Hart, A.H., L. Hartley, M. Ibrahim, and L. Robb. 2004. Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 230:187-198.
- Hasegawa, K., Y.W. Chang, H. Li, Y. Berlin, O. Ikeda, N. Kane-Goldsmith, and M. Grumet. 2005. Embryonic radial glia bridge spinal cord lesions and promote functional recovery following spinal cord injury. *Experimental neurology*. 193:394-410.
- Hastie, N.D., M. Dempster, M.G. Dunlop, A.M. Thompson, D.K. Green, and R.C. Allshire. 1990. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature*. 346:866-868.
- Hay, E., A. Nouraud, and P.J. Marie. 2009. N-cadherin negatively regulates osteoblast proliferation and survival by antagonizing Wnt, ERK and PI3K/Akt signalling. *PLoS one*. 4:e8284.
- Hayashi, T., H. Kokubo, B.H. Hartman, C.A. Ray, T.A. Reh, and O. Bermingham-McDonogh. 2008. Hes1 and Hes2 may act as early effectors of Notch signaling in the developing cochlea. *Developmental biology*. 316:87-99.
- He, Q., G. Wang, S. Wakade, S. Dasgupta, M. Dinkins, J.N. Kong, S.D. Spassieva, and E. Bieberich. 2014. Primary cilia in stem cells and neural progenitors are regulated by neutral sphingomyelinase 2 and ceramide. *Molecular biology of the cell*. 25:1715-1729.
- Hearn, T., G.L. Renforth, C. Spalluto, N.A. Hanley, K. Piper, S. Brickwood, C. White, V. Connolly, J.F. Taylor, I. Russell-Eggitt, D. Bonneau, M. Walker, and D.I. Wilson. 2002. Mutation of ALMS1, a large gene with a tandem repeat encoding 47 amino acids, causes Alstrom syndrome. *Nature genetics*. 31:79-83.
- Hearn, T., C. Spalluto, V.J. Phillips, G.L. Renforth, N. Copin, N.A. Hanley, and D.I. Wilson. 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*. 54:1581-1587.
- Helyer, R., D. Cacciabue-Rivolta, D. Davies, M.N. Rivolta, C.J. Kros, and M.C. Holley. 2007. A model for mammalian cochlear hair cell differentiation in vitro: effects of retinoic acid on cytoskeletal proteins and potassium conductances. *The European journal of neuroscience*. 25:957-973.
- Hentze, M.W., and A.E. Kulozik. 1999. A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell*. 96:307-310.
- Herr, W., and M.A. Cleary. 1995. The POU domain: versatility in transcriptional regulation by a flexible two-in-one DNA-binding domain. *Genes & development*. 9:1679-1693.
- Hochedlinger, K., and R. Jaenisch. 2006. Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature*. 441:1061-1067.
- Hockemeyer, D., F. Soldner, C. Beard, Q. Gao, M. Mitalipova, R.C. DeKever, G.E. Katibah, R. Amora, E.A. Boydston, B. Zeitler, X. Meng, J.C. Miller, L. Zhang, E.J. Rebar, P.D. Gregory, F.D. Urnov, and R. Jaenisch. 2009. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nature biotechnology*. 27:851-857.
- Hockemeyer, D., H. Wang, S. Kiani, C.S. Lai, Q. Gao, J.P. Cassady, G.J. Cost, L. Zhang, Y. Santiago, J.C. Miller, B. Zeitler, J.M. Cherone, X. Meng, S.J. Hinkley, E.J. Rebar, P.D. Gregory, F.D. Urnov, and R. Jaenisch. 2011. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nature biotechnology*. 29:731-734.

- Holubcova, Z., P. Matula, M. Sedlackova, V. Vinarsky, D. Dolezalova, T. Barta, P. Dvorak, and A. Hampl. 2011. Human embryonic stem cells suffer from centrosomal amplification. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 29:46-56.
- Hong, Y., and P.J. Stambrook. 2004. Restoration of an absent G1 arrest and protection from apoptosis in embryonic stem cells after ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:14443-14448.
- Hou, P., Y. Li, X. Zhang, C. Liu, J. Guan, H. Li, T. Zhao, J. Ye, W. Yang, K. Liu, J. Ge, J. Xu, Q. Zhang, Y. Zhao, and H. Deng. 2013. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science (New York, N.Y.)*. 341:651-654.
- Hsu, P.D., E.S. Lander, and F. Zhang. 2014. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. 157:1262-1278.
- Hsu, P.D., D.A. Scott, J.A. Weinstein, F.A. Ran, S. Konermann, V. Agarwala, Y. Li, E.J. Fine, X. Wu, O. Shalem, T.J. Cradick, L.A. Marraffini, G. Bao, and F. Zhang. 2013. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature biotechnology*. 31:827-832.
- Huang, X., Y. Wang, W. Yan, C. Smith, Z. Ye, J. Wang, Y. Gao, L. Mendelsohn, and L. Cheng. 2015. Production of Gene-Corrected Adult Beta Globin Protein in Human Erythrocytes Differentiated from Patient iPSCs After Genome Editing of the Sickle Point Mutation. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 33:1470-1479.
- Huangfu, D., R. Maehr, W. Guo, A. Eijkelenboom, M. Snitow, A.E. Chen, and D.A. Melton. 2008. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nature biotechnology*. 26:795-797.
- Hughes, J.P., S. Rees, S.B. Kalindjian, and K.L. Philpott. 2011. Principles of early drug discovery. *British journal of pharmacology*. 162:1239-1249.
- Hussein, S.M., N.N. Batada, S. Vuoristo, R.W. Ching, R. Autio, E. Narva, S. Ng, M. Sourour, R. Hamalainen, C. Olsson, K. Lundin, M. Mikkola, R. Trokovic, M. Peitz, O. Brustle, D.P. Bazett-Jones, K. Alitalo, R. Lahesmaa, A. Nagy, and T. Otonkoski. 2011. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature*. 471:58-62.
- Hyslop, L., M. Stojkovic, L. Armstrong, T. Walter, P. Stojkovic, S. Przyborski, M. Herbert, A. Murdoch, T. Strachan, and M. Lako. 2005. Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 23:1035-1043.
- Isalan, M. 2012. Zinc-finger nucleases: how to play two good hands. *Nature methods*. 9:32-34.
- Israel, M.A., S.H. Yuan, C. Bardy, S.M. Reyna, Y. Mu, C. Herrera, M.P. Hefferan, S. Van Gorp, K.L. Nazor, F.S. Boscolo, C.T. Carson, L.C. Laurent, M. Marsala, F.H. Gage, A.M. Remes, E.H. Koo, and L.S. Goldstein. 2012. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature*. 482:216-220.
- Itoh, N. 2007. The Fgf families in humans, mice, and zebrafish: their evolutionary processes and roles in development, metabolism, and disease. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 30:1819-1825.
- Itskovitz-Eldor, J., M. Schuldiner, D. Karsenti, A. Eden, O. Yanuka, M. Amit, H. Soreq, and N. Benvenisty. 2000. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*. 6:88-95.
- Itzhaki, I., L. Maizels, I. Huber, L. Zwi-Dantsis, O. Caspi, A. Winterstern, O. Feldman, A. Gepstein, G. Arbel, H. Hammerman, M. Boulos, and L. Gepstein. 2011. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature*. 471:225-229.

- Jacques, B.E., M.E. Montcouquiol, E.M. Layman, M. Lewandoski, and M.W. Kelley. 2007. Fgf8 induces pillar cell fate and regulates cellular patterning in the mammalian cochlea. *Development*. 134:3021-3029.
- Jaffe, A.B., and A. Hall. 2005. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annual review of cell and developmental biology*. 21:247-269.
- Jagger, D., G. Collin, J. Kelly, E. Towers, G. Nevill, C. Longo-Guess, J. Benson, K. Halsey, D. Dolan, J. Marshall, J. Naggert, and A. Forge. 2011. Alstrom Syndrome protein ALMS1 localizes to basal bodies of cochlear hair cells and regulates cilium-dependent planar cell polarity. *Human molecular genetics*. 20:466-481.
- James, D., H.S. Nam, M. Seandel, D. Nolan, T. Janovitz, M. Tomishima, L. Studer, G. Lee, D. Lyden, R. Benezra, N. Zaninovic, Z. Rosenwaks, S.Y. Rabbany, and S. Rafii. 2010. Expansion and maintenance of human embryonic stem cell-derived endothelial cells by TGFbeta inhibition is Id1 dependent. *Nature biotechnology*. 28:161-166.
- Ji, J., S.H. Ng, V. Sharma, D. Neculai, S. Hussein, M. Sam, Q. Trinh, G.M. Church, J.D. McPherson, A. Nagy, and N.N. Batada. 2012. Elevated coding mutation rate during the reprogramming of human somatic cells into induced pluripotent stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 30:435-440.
- Jiang, J., Y.S. Chan, Y.H. Loh, J. Cai, G.Q. Tong, C.A. Lim, P. Robson, S. Zhong, and H.H. Ng. 2008. A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nature cell biology*. 10:353-360.
- Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J.A. Doudna, and E. Charpentier. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*. 337:816-821.
- Jinek, M., A. East, A. Cheng, S. Lin, E. Ma, and J. Doudna. 2013. RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife*. 2:e00471.
- Joy, T., H. Cao, G. Black, R. Malik, V. Charlton-Menys, R.A. Hegele, and P.N. Durrington. 2007. Alstrom syndrome (OMIM 203800): a case report and literature review. *Orphanet journal of rare diseases*. 2:49.
- Jurczyk, A., A. Gromley, S. Redick, J. San Agustin, G. Witman, G.J. Pazour, D.J. Peters, and S. Doxsey. 2004. Pericentrin forms a complex with intraflagellar transport proteins and polycystin-2 and is required for primary cilia assembly. *The Journal of cell biology*. 166:637-643.
- Kamachi, Y., M. Uchikawa, and H. Kondoh. 2000. Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends in genetics : TIG*. 16:182-187.
- Kanzaki, S., L.A. Beyer, D.L. Swiderski, M. Izumikawa, T. Stover, K. Kawamoto, and Y. Raphael. 2006. p27(Kip1) deficiency causes organ of Corti pathology and hearing loss. *Hearing research*. 214:28-36.
- Kapinas, K., R. Grandy, P. Ghule, R. Medina, K. Becker, A. Pardee, S.K. Zaidi, J. Lian, J. Stein, A. van Wijnen, and G. Stein. 2013. The abbreviated pluripotent cell cycle. *Journal of cellular physiology*. 228:9-20.
- Kawashima, Y., G.S. Geleoc, K. Kurima, V. Labay, A. Lelli, Y. Asai, T. Makishima, D.K. Wu, C.C. Della Santina, J.R. Holt, and A.J. Griffith. 2011. Mechanotransduction in mouse inner ear hair cells requires transmembrane channel-like genes. *The Journal of clinical investigation*. 121:4796-4809.
- Kelley, M.W. 2006. Regulation of cell fate in the sensory epithelia of the inner ear. *Nature reviews. Neuroscience*. 7:837-849.

- Kiernan, A.E., R. Cordes, R. Kopan, A. Gossler, and T. Gridley. 2005. The Notch ligands DLL1 and JAG2 act synergistically to regulate hair cell development in the mammalian inner ear. *Development*. 132:4353-4362.
- Kiernan, A.E., J. Xu, and T. Gridley. 2006. The Notch ligand JAG1 is required for sensory progenitor development in the mammalian inner ear. *PLoS genetics*. 2:e4.
- Kim, D., C.H. Kim, J.I. Moon, Y.G. Chung, M.Y. Chang, B.S. Han, S. Ko, E. Yang, K.Y. Cha, R. Lanza, and K.S. Kim. 2009. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell stem cell*. 4:472-476.
- Kim, J.C., J.L. Badano, S. Sibold, M.A. Esmail, J. Hill, B.E. Hoskins, C.C. Leitch, K. Venner, S.J. Ansley, A.J. Ross, M.R. Leroux, N. Katsanis, and P.L. Beales. 2004. The Bardet-Biedl protein BBS4 targets cargo to the pericentriolar region and is required for microtubule anchoring and cell cycle progression. *Nature genetics*. 36:462-470.
- Kim, S., K. Lee, J.H. Choi, N. Ringstad, and B.D. Dynlacht. 2015. Nek2 activation of Kif24 ensures cilium disassembly during the cell cycle. *Nature communications*. 6:8087.
- Kim, Y.G., J. Cha, and S. Chandrasegaran. 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93:1156-1160.
- Kiprilov, E.N., A. Awan, R. Desprat, M. Velho, C.A. Clement, A.G. Byskov, C.Y. Andersen, P. Satir, E.E. Bouhassira, S.T. Christensen, and R.E. Hirsch. 2008. Human embryonic stem cells in culture possess primary cilia with hedgehog signaling machinery. *The Journal of cell biology*. 180:897-904.
- Knorz, V.J., C. Spalluto, M. Lessard, T.L. Purvis, F.F. Adigun, G.B. Collin, N.A. Hanley, D.I. Wilson, and T. Hearn. 2010. Centriolar association of ALMS1 and likely centrosomal functions of the ALMS motif-containing proteins C10orf90 and KIAA1731. *Molecular biology of the cell*. 21:3617-3629.
- Koch, P., T. Opitz, J.A. Steinbeck, J. Ladewig, and O. Brustle. 2009. A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:3225-3230.
- Koehler, K.R., and E. Hashino. 2014. 3D mouse embryonic stem cell culture for generating inner ear organoids. *Nature protocols*. 9:1229-1244.
- Koehler, K.R., A.M. Mikosz, A.I. Molosh, D. Patel, and E. Hashino. 2013. Generation of inner ear sensory epithelia from pluripotent stem cells in 3D culture. *Nature*. 500:217-221.
- Kopecky, B.J., I. Jahan, and B. Fritsch. 2013. Correct timing of proliferation and differentiation is necessary for normal inner ear development and auditory hair cell viability. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 242:132-147.
- Krawetz, R.J., X. Li, and D.E. Rancourt. 2009. Human embryonic stem cells: caught between a ROCK inhibitor and a hard place. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 31:336-343.
- Krelova, J., L.Z. Holland, M. Schubert, C. Burgtorf, V. Benes, and Z. Kozmik. 2002. Functional equivalency of amphioxus and vertebrate Pax258 transcription factors suggests that the activation of mid-hindbrain specific genes in vertebrates occurs via the recruitment of Pax regulatory elements. *Gene*. 282:143-150.
- Kruegel, J., D. Rubel, and O. Gross. 2013. Alport syndrome--insights from basic and clinical research. *Nature reviews. Nephrology*. 9:170-178.

- Kulaga, H.M., C.C. Leitch, E.R. Eichers, J.L. Badano, A. Lesemann, B.E. Hoskins, J.R. Lupski, P.L. Beales, R.R. Reed, and N. Katsanis. 2004. Loss of BBS proteins causes anosmia in humans and defects in olfactory cilia structure and function in the mouse. *Nature genetics*. 36:994-998.
- Kumar, R., L. DiMenna, N. Schrode, T.C. Liu, P. Franck, S. Munoz-Descalzo, A.K. Hadjantonakis, A.A. Zarrin, J. Chaudhuri, O. Elemento, and T. Evans. 2013. AID stabilizes stem-cell phenotype by removing epigenetic memory of pluripotency genes. *Nature*. 500:89-92.
- Kumar, S.S., A.A. Alarfaj, M.A. Munusamy, A.J. Singh, I.C. Peng, S.P. Priya, R.A. Hamat, and A. Higuchi. 2014. Recent developments in beta-cell differentiation of pluripotent stem cells induced by small and large molecules. *International journal of molecular sciences*. 15:23418-23447.
- Lachmann, N., M. Ackermann, E. Frenzel, S. Liebhaber, S. Brenning, C. Happle, D. Hoffmann, O. Klimenkova, D. Luttge, T. Buchegger, M.P. Kuhnel, A. Schambach, S. Janciauskiene, C. Figueiredo, G. Hansen, J. Skokowa, and T. Moritz. 2015. Large-scale hematopoietic differentiation of human induced pluripotent stem cells provides granulocytes or macrophages for cell replacement therapies. *Stem cell reports*. 4:282-296.
- Ladher, R.K., K.U. Anakwe, A.L. Gurney, G.C. Schoenwolf, and P.H. Francis-West. 2000. Identification of synergistic signals initiating inner ear development. *Science (New York, N.Y.)*. 290:1965-1967.
- Ladher, R.K., P. O'Neill, and J. Begbie. 2010. From shared lineage to distinct functions: the development of the inner ear and epibranchial placodes. *Development*. 137:1777-1785.
- Lahti, A.L., V.J. Kujala, H. Chapman, A.P. Koivisto, M. Pekkanen-Mattila, E. Kerkela, J. Hyttinen, K. Kontula, H. Swan, B.R. Conklin, S. Yamanaka, O. Silvennoinen, and K. Aalto-Setälä. 2012. Model for long QT syndrome type 2 using human iPS cells demonstrates arrhythmogenic characteristics in cell culture. *Disease models & mechanisms*. 5:220-230.
- Laine, H., M. Sulg, A. Kirjavainen, and U. Pirvola. 2010. Cell cycle regulation in the inner ear sensory epithelia: role of cyclin D1 and cyclin-dependent kinase inhibitors. *Developmental biology*. 337:134-146.
- Lamba, D.A., M.O. Karl, C.B. Ware, and T.A. Reh. 2006. Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:12769-12774.
- Lanford, P.J. 1999. Notch signalling pathway mediates hair cell development in mammalian cochlea. *Nature Genet*. 21:289-292.
- Lanford, P.J., C. Platt, and A.N. Popper. 2000. Structure and function in the saccule of the goldfish (*Carassius auratus*): a model of diversity in the non-amniote ear. *Hearing research*. 143:1-13.
- Lanner, F., and J. Rossant. 2010. The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. *Development*. 137:3351-3360.
- Laslett, A.L., A.A. Filipczyk, and M.F. Pera. 2003. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Trends in cardiovascular medicine*. 13:295-301.
- Laurent, L.C. 2008. MicroRNAs in embryonic stem cells and early embryonic development. *Journal of cellular and molecular medicine*. 12:2181-2188.
- Laurent, L.C., I. Ulitsky, I. Slavin, H. Tran, A. Schork, R. Morey, C. Lynch, J.V. Harness, S. Lee, M.J. Barrero, S. Ku, M. Martynova, R. Semechkin, V. Galat, J. Gottesfeld, J.C. Izpisua Belmonte, C. Murry, H.S. Keirstead, H.S. Park, U. Schmidt, A.L. Laslett, F.J. Muller,

- C.M. Nievergelt, R. Shamir, and J.F. Loring. 2011. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell stem cell*. 8:106-118.
- Lee, G., E.P. Papapetrou, H. Kim, S.M. Chambers, M.J. Tomishima, C.A. Fasano, Y.M. Ganat, J. Menon, F. Shimizu, A. Viale, V. Tabar, M. Sadelain, and L. Studer. 2009. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature*. 461:402-406.
- Lee, Y.S., F. Liu, and N. Segil. 2006. A morphogenetic wave of p27Kip1 transcription directs cell cycle exit during organ of Corti development. *Development*. 133:2817-2826.
- Lees, K.R., D. Barer, G.A. Ford, W. Hacke, V. Kostulas, A.K. Sharma, and T. Odergren. 2003. Tolerability of NXY-059 at higher target concentrations in patients with acute stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 34:482-487.
- Lefebvre, V., B. Dumitriu, A. Penzo-Mendez, Y. Han, and B. Pallavi. 2007. Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 39:2195-2214.
- Leitch, C.C., S. Lodh, V. Prieto-Echague, J.L. Badano, and N.A. Zaghoul. 2014. Basal body proteins regulate Notch signaling through endosomal trafficking. *Journal of cell science*. 127:2407-2419.
- Leonardo, T.R., H.L. Schultheisz, J.F. Loring, and L.C. Laurent. 2012. The functions of microRNAs in pluripotency and reprogramming. *Nature cell biology*. 14:1114-1121.
- Li, G., R. Vega, K. Nelms, N. Gekakis, C. Goodnow, P. McNamara, H. Wu, N.A. Hong, and R. Glynn. 2007a. A role for Alstrom syndrome protein, *alms1*, in kidney ciliogenesis and cellular quiescence. *PLoS genetics*. 3:e8.
- Li, H., C.E. Corrales, Z. Wang, Y. Zhao, Y. Wang, H. Liu, and S. Heller. 2005. BMP4 signaling is involved in the generation of inner ear sensory epithelia. *BMC developmental biology*. 5:16.
- Li, H., G. Roblin, H. Liu, and S. Heller. 2003. Generation of hair cells by stepwise differentiation of embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:13495-13500.
- Li, H.L., N. Fujimoto, N. Sasakawa, S. Shirai, T. Ohkame, T. Sakuma, M. Tanaka, N. Amano, A. Watanabe, H. Sakurai, T. Yamamoto, S. Yamanaka, and A. Hotta. 2015. Precise correction of the dystrophin gene in duchenne muscular dystrophy patient induced pluripotent stem cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem cell reports*. 4:143-154.
- Li, J., G. Wang, C. Wang, Y. Zhao, H. Zhang, Z. Tan, Z. Song, M. Ding, and H. Deng. 2007b. MEK/ERK signaling contributes to the maintenance of human embryonic stem cell self-renewal. *Differentiation; research in biological diversity*. 75:299-307.
- Li, M., L. Pevny, R. Lovell-Badge, and A. Smith. 1998. Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. *Current biology : CB*. 8:971-974.
- Lim, H.H., T. Zhang, and U. Surana. 2009. Regulation of centrosome separation in yeast and vertebrates: common threads. *Trends in cell biology*. 19:325-333.
- Lin, S., B.T. Staahl, R.K. Alla, and J.A. Doudna. 2014a. Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing of CRISPR/Cas9 delivery. *eLife*. 3:e04766.
- Lin, Y., T.J. Cradick, M.T. Brown, H. Deshmukh, P. Ranjan, N. Sarode, B.M. Wile, P.M. Vertino, F.J. Stewart, and G. Bao. 2014b. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. *Nucleic acids research*. 42:7473-7485.

- Lister, R., M. Pelizzola, Y.S. Kida, R.D. Hawkins, J.R. Nery, G. Hon, J. Antosiewicz-Bourget, R. O'Malley, R. Castanon, S. Klugman, M. Downes, R. Yu, R. Stewart, B. Ren, J.A. Thomson, R.M. Evans, and J.R. Ecker. 2011. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature*. 471:68-73.
- Litsiou, A., S. Hanson, and A. Streit. 2005. A balance of FGF, BMP and WNT signalling positions the future placode territory in the head. *Development*. 132:4051-4062.
- Liu, Q., and J.V. Ruderman. 2006. Aurora A, mitotic entry, and spindle bipolarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:5811-5816.
- Lleras-Forero, L., and A. Streit. 2012. Development of the sensory nervous system in the vertebrate head: the importance of being on time. *Current opinion in genetics & development*. 22:315-322.
- Locher, H., J.H. Frijns, L. van Iperen, J.C. de Groot, M.A. Huisman, and S.M. Chuva de Sousa Lopes. 2013. Neurosensory development and cell fate determination in the human cochlea. *Neural development*. 8:20.
- Loh, Y.H., Q. Wu, J.L. Chew, V.B. Vega, W. Zhang, X. Chen, G. Bourque, J. George, B. Leong, J. Liu, K.Y. Wong, K.W. Sung, C.W. Lee, X.D. Zhao, K.P. Chiu, L. Lipovich, V.A. Kuznetsov, P. Robson, L.W. Stanton, C.L. Wei, Y. Ruan, B. Lim, and H.H. Ng. 2006. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature genetics*. 38:431-440.
- Lombardo, A., P. Genovese, C.M. Beausejour, S. Colleoni, Y.L. Lee, K.A. Kim, D. Ando, F.D. Urnov, C. Galli, P.D. Gregory, M.C. Holmes, and L. Naldini. 2007. Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nature biotechnology*. 25:1298-1306.
- Louw, J.J., A. Corveleyn, Y. Jia, S. Iqbal, D. Boshoff, M. Gewillig, H. Peeters, P. Moerman, and K. Devriendt. 2014. Homozygous loss-of-function mutation in ALMS1 causes the lethal disorder mitogenic cardiomyopathy in two siblings. *European journal of medical genetics*. 57:532-535.
- Lowenheim, H. 1999. Gene disruption of p27Kip1 allows cell proliferation in the postnatal and adult organ of corti. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 96:4084-4088.
- Lu, H.R., E. Vlamincx, A.N. Hermans, J. Rohrbacher, K. Van Ammel, R. Towart, M. Pugsley, and D.J. Gallacher. 2008. Predicting drug-induced changes in QT interval and arrhythmias: QT-shortening drugs point to gaps in the ICHS7B Guidelines. *British journal of pharmacology*. 154:1427-1438.
- Mackereth, M.D., S.J. Kwak, A. Fritz, and B.B. Riley. 2005. Zebrafish pax8 is required for otic placode induction and plays a redundant role with Pax2 genes in the maintenance of the otic placode. *Development*. 132:371-382.
- Maherali, N., R. Sridharan, W. Xie, J. Utikal, S. Eminli, K. Arnold, M. Stadtfeld, R. Yachechko, J. Tchieu, R. Jaenisch, K. Plath, and K. Hochedlinger. 2007. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell stem cell*. 1:55-70.
- Mahmoud, A.I., F. Kocabas, S.A. Muralidhar, W. Kimura, A.S. Koura, S. Thet, E.R. Porrello, and H.A. Sadek. 2013. Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. *Nature*. 497:249-253.
- Maier, E.C., A. Saxena, B. Alsina, M.E. Bronner, and T.T. Whitfield. 2014. Sensational placodes: neurogenesis in the otic and olfactory systems. *Developmental biology*. 389:50-67.

- Mak, A.C., I.Y. Szeto, B. Fritsch, and K.S. Cheah. 2009. Differential and overlapping expression pattern of SOX2 and SOX9 in inner ear development. *Gene expression patterns : GEP.* 9:444-453.
- Mali, P., J. Aach, P.B. Stranges, K.M. Esvelt, M. Moosburner, S. Kosuri, L. Yang, and G.M. Church. 2013a. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nature biotechnology.* 31:833-838.
- Mali, P., L. Yang, K.M. Esvelt, J. Aach, M. Guell, J.E. DiCarlo, J.E. Norville, and G.M. Church. 2013b. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science (New York, N.Y.).* 339:823-826.
- Manara, R., V. Citton, P. Maffei, J.D. Marshall, J.K. Naggert, G. Milan, R. Vettor, A. Baglione, A. Vitale, C. Briani, F. Di Salle, and A. Favaro. 2015. Degeneration and plasticity of the optic pathway in Alstrom syndrome. *AJNR. American journal of neuroradiology.* 36:160-165.
- Marchetto, M.C., C. Carromeu, A. Acab, D. Yu, G.W. Yeo, Y. Mu, G. Chen, F.H. Gage, and A.R. Muotri. 2010. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell.* 143:527-539.
- Marchetto, M.C., G.W. Yeo, O. Kainohana, M. Marsala, F.H. Gage, and A.R. Muotri. 2009. Transcriptional signature and memory retention of human-induced pluripotent stem cells. *PloS one.* 4:e7076.
- Marion, R.M., K. Strati, H. Li, M. Murga, R. Blanco, S. Ortega, O. Fernandez-Capetillo, M. Serrano, and M.A. Blasco. 2009a. A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature.* 460:1149-1153.
- Marion, R.M., K. Strati, H. Li, A. Tejera, S. Schoeftner, S. Ortega, M. Serrano, and M.A. Blasco. 2009b. Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell.* 4:141-154.
- Marshall, J.D., S. Beck, P. Maffei, and J.K. Naggert. 2007. Alstrom syndrome. *European journal of human genetics : EJHG.* 15:1193-1202.
- Marshall, J.D., R.T. Bronson, G.B. Collin, A.D. Nordstrom, P. Maffei, R.B. Paisey, C. Carey, S. Macdermott, I. Russell-Eggitt, S.E. Shea, J. Davis, S. Beck, G. Shatirishvili, C.M. Mihai, M. Hoeltzenbein, G.B. Pozzan, I. Hopkinson, N. Siculo, J.K. Naggert, and P.M. Nishina. 2005. New Alstrom syndrome phenotypes based on the evaluation of 182 cases. *Archives of internal medicine.* 165:675-683.
- Marshall, J.D., M.D. Ludman, S.E. Shea, S.R. Salisbury, S.M. Willi, R.G. LaRoche, and P.M. Nishina. 1997. Genealogy, natural history, and phenotype of Alstrom syndrome in a large Acadian kindred and three additional families. *American journal of medical genetics.* 73:150-161.
- Marshall, J.D., P. Maffei, G.B. Collin, and J.K. Naggert. 2011. Alstrom syndrome: genetics and clinical overview. *Current genomics.* 12:225-235.
- Marshall, J.D., J. Muller, G.B. Collin, G. Milan, S.F. Kingsmore, D. Dinwiddie, E.G. Farrow, N.A. Miller, F. Favaretto, P. Maffei, H. Dollfus, R. Vettor, and J.K. Naggert. 2015. Alstrom Syndrome: Mutation Spectrum of ALMS1. *Human mutation.* 36:660-668.
- Marshall, W.F. 2008. The cell biological basis of ciliary disease. *The Journal of cell biology.* 180:17-21.
- Martin, K., and A.K. Groves. 2006a. Competence of cranial ectoderm to respond to Fgf signaling suggests a two-step model of otic placode induction. *Development.* 133:877-887.

- Martin, K., and A.K. Groves. 2006b. Competence of cranial ectoderm to respond to Fgf signalling suggests a two-step model of otic placode induction. *Development*. 133:877-887.
- Martinez-Campos, M., R. Basto, J. Baker, M. Kernan, and J.W. Raff. 2004. The Drosophila pericentrin-like protein is essential for cilia/flagella function, but appears to be dispensable for mitosis. *The Journal of cell biology*. 165:673-683.
- Martinez-Monedero, R., E. Yi, K. Oshima, E. Glowatzki, and A.S. Edge. 2008. Differentiation of inner ear stem cells to functional sensory neurons. *Developmental neurobiology*. 68:669-684.
- Masumoto, H., T. Ikuno, M. Takeda, H. Fukushima, A. Marui, S. Katayama, T. Shimizu, T. Ikeda, T. Okano, R. Sakata, and J.K. Yamashita. 2014. Human iPS cell-engineered cardiac tissue sheets with cardiomyocytes and vascular cells for cardiac regeneration. *Scientific reports*. 4:6716.
- Matsa, E., D. Rajamohan, E. Dick, L. Young, I. Mellor, A. Staniforth, and C. Denning. 2011. Drug evaluation in cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells carrying a long QT syndrome type 2 mutation. *European heart journal*. 32:952-962.
- Matsubara, H., T. Takeuchi, E. Nishikawa, K. Yanagisawa, Y. Hayashita, H. Ebi, H. Yamada, M. Suzuki, M. Nagino, Y. Nimura, H. Osada, and T. Takahashi. 2007. Apoptosis induction by antisense oligonucleotides against miR-17-5p and miR-20a in lung cancers overexpressing miR-17-92. *Oncogene*. 26:6099-6105.
- Mayor, T., U. Hacker, Y.D. Stierhof, and E.A. Nigg. 2002. The mechanism regulating the dissociation of the centrosomal protein C-Nap1 from mitotic spindle poles. *Journal of cell science*. 115:3275-3284.
- Mayshar, Y., U. Ben-David, N. Lavon, J.C. Biancotti, B. Yakir, A.T. Clark, K. Plath, W.E. Lowry, and N. Benvenisty. 2010. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell*. 7:521-531.
- McConnell, B.B., and V.W. Yang. 2010. Mammalian Kruppel-like factors in health and diseases. *Physiological reviews*. 90:1337-1381.
- McLean, A.B., K.A. D'Amour, K.L. Jones, M. Krishnamoorthy, M.J. Kulik, D.M. Reynolds, A.M. Sheppard, H. Liu, Y. Xu, E.E. Baetge, and S. Dalton. 2007. Activin efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 25:29-38.
- Merkle, F.T., W.M. Neuhusser, D. Santos, E. Valen, J.A. Gagnon, K. Maas, J. Sandoe, A.F. Schier, and K. Eggan. 2015. Efficient CRISPR-Cas9-mediated generation of knockin human pluripotent stem cells lacking undesired mutations at the targeted locus. *Cell reports*. 11:875-883.
- Meyer, N., and L.Z. Penn. 2008. Reflecting on 25 years with MYC. *Nature reviews. Cancer*. 8:976-990.
- Michaud, J.L., E. Heon, F. Guilbert, J. Weill, B. Puech, L. Benson, J.F. Smallhorn, C.T. Shuman, J.R. Buncic, A.V. Levin, R. Weksberg, and G.M. Breviere. 1996. Natural history of Alstrom syndrome in early childhood: onset with dilated cardiomyopathy. *The Journal of pediatrics*. 128:225-229.
- Mikkelsen, T.S., J. Hanna, X. Zhang, M. Ku, M. Wernig, P. Schorderet, B.E. Bernstein, R. Jaenisch, E.S. Lander, and A. Meissner. 2008. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*. 454:49-55.

- Mikkelsen, T.S., M. Ku, D.B. Jaffe, B. Issac, E. Lieberman, G. Giannoukos, P. Alvarez, W. Brockman, T.K. Kim, R.P. Koche, W. Lee, E. Mendenhall, A. O'Donovan, A. Presser, C. Russ, X. Xie, A. Meissner, M. Wernig, R. Jaenisch, C. Nusbaum, E.S. Lander, and B.E. Bernstein. 2007. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*. 448:553-560.
- Mikule, K., B. Delaval, P. Kaldis, A. Jurczyk, P. Hergert, and S. Doxsey. 2007. Loss of centrosome integrity induces p38-p53-p21-dependent G1-S arrest. *Nature cell biology*. 9:160-170.
- Mitne-Neto, M., M. Machado-Costa, M.C. Marchetto, M.H. Bengtson, C.A. Joazeiro, H. Tsuda, H.J. Bellen, H.C. Silva, A.S. Oliveira, M. Lazar, A.R. Muotri, and M. Zatz. 2011. Downregulation of VAPB expression in motor neurons derived from induced pluripotent stem cells of ALS8 patients. *Human molecular genetics*. 20:3642-3652.
- Mitsui, K., Y. Tokuzawa, H. Itoh, K. Segawa, M. Murakami, K. Takahashi, M. Maruyama, M. Maeda, and S. Yamanaka. 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. 113:631-642.
- Miyamoto, Y., F. Sakane, and K. Hashimoto. 2015. N-cadherin-based adherens junction regulates the maintenance, proliferation, and differentiation of neural progenitor cells during development. *Cell adhesion & migration*. 9:183-192.
- Miyoshi, N., H. Ishii, H. Nagano, N. Haraguchi, D.L. Dewi, Y. Kano, S. Nishikawa, M. Tanemura, K. Mimori, F. Tanaka, T. Saito, J. Nishimura, I. Takemasa, T. Mizushima, M. Ikeda, H. Yamamoto, M. Sekimoto, Y. Doki, and M. Mori. 2011. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell stem cell*. 8:633-638.
- Mizutari, K., M. Fujioka, M. Hosoya, N. Bramhall, H.J. Okano, H. Okano, and A.S. Edge. 2013. Notch inhibition induces cochlear hair cell regeneration and recovery of hearing after acoustic trauma. *Neuron*. 77:58-69.
- Mohammadi, M., S. Froum, J.M. Hamby, M.C. Schroeder, R.L. Panek, G.H. Lu, A.V. Eliseenkova, D. Green, J. Schlessinger, and S.R. Hubbard. 1998. Crystal structure of an angiogenesis inhibitor bound to the FGF receptor tyrosine kinase domain. *The EMBO journal*. 17:5896-5904.
- Moore, J.K., and F.H. Linthicum, Jr. 2007. The human auditory system: a timeline of development. *International journal of audiology*. 46:460-478.
- Mora, C., J.F. Navarro, J. Garcia, E. Gallego, M. Macia, M.L. Mendez, J. Chahin, and A. Rivero. 1999. Autosomal dominant polycystic kidney disease associated with familial sensorineural deafness. *Scandinavian journal of urology and nephrology*. 33:63-65.
- Moretti, A., M. Bellin, C.B. Jung, T.M. Thies, Y. Takashima, A. Bernshausen, M. Schiemann, S. Fischer, S. Moosmang, A.G. Smith, J.T. Lam, and K.L. Laugwitz. 2010. Mouse and human induced pluripotent stem cells as a source for multipotent Isl1+ cardiovascular progenitors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 24:700-711.
- Morgan, D.O. 1997. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annual review of cell and developmental biology*. 13:261-291.
- Morin, R.D., M.D. O'Connor, M. Griffith, F. Kuchenbauer, A. Delaney, A.L. Prabhu, Y. Zhao, H. McDonald, T. Zeng, M. Hirst, C.J. Eaves, and M.A. Marra. 2008. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome research*. 18:610-621.

- Morrison, A., C. Hodgetts, A. Gossler, M. Hrabe de Angelis, and J. Lewis. 1999. Expression of Delta1 and Serrate1 (Jagged1) in the mouse inner ear. *Mech. Dev.* 84:169-172.
- Mueller, K.L., B.E. Jacques, and M.W. Kelley. 2002. Fibroblast growth factor signaling regulates pillar cell development in the organ of corti. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 22:9368-9377.
- Muhlhans, J., J.H. Brandstatter, and A. Giessl. 2011. The centrosomal protein pericentrin identified at the basal body complex of the connecting cilium in mouse photoreceptors. *PloS one.* 6:e26496.
- Mui, K.L., Y.H. Bae, L. Gao, S.L. Liu, T. Xu, G.L. Radice, C.S. Chen, and R.K. Assoian. 2015. N-Cadherin Induction by ECM Stiffness and FAK Overrides the Spreading Requirement for Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells. *Cell reports.*
- Mullen, A.C., D.A. Orlando, J.J. Newman, J. Loven, R.M. Kumar, S. Bilodeau, J. Reddy, M.G. Guenther, R.P. DeKoter, and R.A. Young. 2011. Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF-beta signaling. *Cell.* 147:565-576.
- Nachury, M.V., A.V. Loktev, Q. Zhang, C.J. Westlake, J. Peranen, A. Merdes, D.C. Slusarski, R.H. Scheller, J.F. Bazan, V.C. Sheffield, and P.K. Jackson. 2007. A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. *Cell.* 129:1201-1213.
- Nadol, J.B., Jr., J.D. Marshall, and R.T. Bronson. 2015. Histopathology of the Human Inner Ear in Alstrom's Syndrome. *Audiology & neuro-otology.* 20:267-272.
- Nakagawa, M., M. Koyanagi, K. Tanabe, K. Takahashi, T. Ichisaka, T. Aoi, K. Okita, Y. Mochizuki, N. Takizawa, and S. Yamanaka. 2008. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature biotechnology.* 26:101-106.
- Nauli, S.M., F.J. Alenghat, Y. Luo, E. Williams, P. Vassilev, X. Li, A.E. Elia, W. Lu, E.M. Brown, S.J. Quinn, D.E. Ingber, and J. Zhou. 2003. Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nature genetics.* 33:129-137.
- Navarro, P., M. Gomez, A. Pizarro, C. Gamallo, M. Quintanilla, and A. Cano. 1991. A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *The Journal of cell biology.* 115:517-533.
- Neganova, I., and M. Lako. 2008. G1 to S phase cell cycle transition in somatic and embryonic stem cells. *Journal of anatomy.* 213:30-44.
- Neganova, I., F. Vilella, S.P. Atkinson, M. Lloret, J.F. Passos, T. von Zglinicki, J.E. O'Connor, D. Burks, R. Jones, L. Armstrong, and M. Lako. 2011. An important role for CDK2 in G1 to S checkpoint activation and DNA damage response in human embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio).* 29:651-659.
- Neganova, I., X. Zhang, S. Atkinson, and M. Lako. 2009. Expression and functional analysis of G1 to S regulatory components reveals an important role for CDK2 in cell cycle regulation in human embryonic stem cells. *Oncogene.* 28:20-30.
- Neves, J., C. Parada, M. Chamizo, and F. Giraldez. 2011. Jagged 1 regulates the restriction of Sox2 expression in the developing chicken inner ear: a mechanism for sensory organ specification. *Development.* 138:735-744.
- Nguyen, H.N., B. Byers, B. Cord, A. Shcheglovitov, J. Byrne, P. Gujar, K. Kee, B. Schule, R.E. Dolmetsch, W. Langston, T.D. Palmer, and R.R. Pera. 2011. LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell stem cell.* 8:267-280.
- Nichols, J., and A. Smith. 2009. Naive and primed pluripotent states. *Cell stem cell.* 4:487-492.

- Nichols, J., B. Zevnik, K. Anastassiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Scholer, and A. Smith. 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*. 95:379-391.
- Nie, B., H. Wang, T. Laurent, and S. Ding. 2012. Cellular reprogramming: a small molecule perspective. *Current opinion in cell biology*. 24:784-792.
- Nigg, E.A., and J.W. Raff. 2009. Centrioles, centrosomes, and cilia in health and disease. *Cell*. 139:663-678.
- Nishikawa, S., and F. Sasaki. 1996. Internalization of styryl dye FM1-43 in the hair cells of lateral line organs in *Xenopus* larvae. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 44:733-741.
- Niwa, H., J. Miyazaki, and A.G. Smith. 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature genetics*. 24:372-376.
- Noyes, M.B., R.G. Christensen, A. Wakabayashi, G.D. Stormo, M.H. Brodsky, and S.A. Wolfe. 2008. Analysis of homeodomain specificities allows the family-wide prediction of preferred recognition sites. *Cell*. 133:1277-1289.
- O'Connor, L., A. Strasser, L.A. O'Reilly, G. Hausmann, J.M. Adams, S. Cory, and D.C. Huang. 1998. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *The EMBO journal*. 17:384-395.
- Oesterle, E.C., S. Campbell, R.R. Taylor, A. Forge, and C.R. Hume. 2008. Sox2 and JAGGED1 expression in normal and drug-damaged adult mouse inner ear. *Journal of the Association for Research in Otolaryngology : JARO*. 9:65-89.
- Oh, E.C., S. Vasanth, and N. Katsanis. 2015. Metabolic regulation and energy homeostasis through the primary Cilium. *Cell metabolism*. 21:21-31.
- Ohgushi, M., M. Matsumura, M. Eiraku, K. Murakami, T. Aramaki, A. Nishiyama, K. Muguruma, T. Nakano, H. Suga, M. Ueno, T. Ishizaki, H. Suemori, S. Narumiya, H. Niwa, and Y. Sasai. 2010. Molecular pathway and cell state responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent stem cells. *Cell stem cell*. 7:225-239.
- Ohi, Y., H. Qin, C. Hong, L. Blouin, J.M. Polo, T. Guo, Z. Qi, S.L. Downey, P.D. Manos, D.J. Rossi, J. Yu, M. Hebrok, K. Hochedlinger, J.F. Costello, J.S. Song, and M. Ramalho-Santos. 2011. Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. *Nature cell biology*. 13:541-549.
- Ohyama, T., A.K. Groves, and K. Martin. 2007. The first steps towards hearing: mechanisms of otic placode induction. *The International journal of developmental biology*. 51:463-472.
- Ohyama, T., O.A. Mohamed, M.M. Taketo, D. Dufort, and A.K. Groves. 2006. Wnt signals mediate a fate decision between otic placode and epidermis. *Development*. 133:865-875.
- Okano, S., L. Lan, K.W. Caldecott, T. Mori, and A. Yasui. 2003. Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells. *Molecular and cellular biology*. 23:3974-3981.
- Okita, K., H. Hong, K. Takahashi, and S. Yamanaka. 2010. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. *Nature protocols*. 5:418-428.
- Okita, K., T. Ichisaka, and S. Yamanaka. 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 448:313-317.
- Oshima, K., K. Shin, M. Diensthuber, A.W. Peng, A.J. Ricci, and S. Heller. 2010. Mechanosensitive hair cell-like cells from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell*. 141:704-716.
- Ostenfeld, T., and C.N. Svendsen. 2004. Requirement for neurogenesis to proceed through the division of neuronal progenitors following differentiation of epidermal growth factor and

- fibroblast growth factor-2-responsive human neural stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 22:798-811.
- Otto, E.A., B. Schermer, T. Obara, J.F. O'Toole, K.S. Hiller, A.M. Mueller, R.G. Ruf, J. Hoefele, F. Beekmann, D. Landau, J.W. Foreman, J.A. Goodship, T. Strachan, A. Kispert, M.T. Wolf, M.F. Gagnadoux, H. Nivet, C. Antignac, G. Walz, I.A. Drummond, T. Benzing, and F. Hildebrandt. 2003. Mutations in *INVS* encoding inversin cause nephronophthisis type 2, linking renal cystic disease to the function of primary cilia and left-right axis determination. *Nature genetics*. 34:413-420.
- Ouji, Y., S. Ishizaka, F. Nakamura-Uchiyama, A. Wanaka, and M. Yoshikawa. 2013. Induction of inner ear hair cell-like cells from *Math1*-transfected mouse ES cells. *Cell death & disease*. 4:e700.
- Ouji, Y., S. Ishizaka, F. Nakamura-Uchiyama, and M. Yoshikawa. 2012. In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells into inner ear hair cell-like cells using stromal cell conditioned medium. *Cell death & disease*. 3:e314.
- Padanad, M.S., N. Bhat, B. Guo, and B.B. Riley. 2012. Conditions that influence the response to Fgf during otic placode induction. *Developmental biology*. 364:1-10.
- Pan, H., W. Zhang, and G.H. Liu. 2011. Find and replace: editing human genome in pluripotent stem cells. *Protein & cell*. 2:950-956.
- Papp, B., and K. Plath. 2011. Reprogramming to pluripotency: stepwise resetting of the epigenetic landscape. *Cell research*. 21:486-501.
- Papp, B., and K. Plath. 2013. Epigenetics of reprogramming to induced pluripotency. *Cell*. 152:1324-1343.
- Park, C.H., and S.H. Lee. 2007. Efficient generation of dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 407:311-322.
- Park, I.H., N. Arora, H. Huo, N. Maherali, T. Ahfeldt, A. Shimamura, M.W. Lensch, C. Cowan, K. Hochedlinger, and G.Q. Daley. 2008. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*. 134:877-886.
- Pasumarthi, K.B., and L.J. Field. 2002. Cardiomyocyte cell cycle regulation. *Circulation research*. 90:1044-1054.
- Pattanayak, V., S. Lin, J.P. Guilinger, E. Ma, J.A. Doudna, and D.R. Liu. 2013. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nature biotechnology*. 31:839-843.
- Patthey, C., and L. Gunhaga. 2011. Specification and regionalisation of the neural plate border. *The European journal of neuroscience*. 34:1516-1528.
- Pera, E.M., O. Wessely, S.Y. Li, and E.M. De Robertis. 2001. Neural and head induction by insulin-like growth factor signals. *Developmental cell*. 1:655-665.
- Petrova, A., A. Celli, L. Jacquet, D. Dafou, D. Crumrine, M. Hupe, M. Arno, C. Hobbs, A. Cvorovic, P. Karagiannis, L. Devito, R. Sun, L.C. Adame, R. Vaughan, J.A. McGrath, T.M. Mauro, and D. Ilic. 2014. 3D In vitro model of a functional epidermal permeability barrier from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Stem cell reports*. 2:675-689.
- Petrovic, J., P. Formosa-Jordan, J.C. Luna-Escalante, G. Abello, M. Ibanes, J. Neves, and F. Giraldez. 2014. Ligand-dependent Notch signaling strength orchestrates lateral induction and lateral inhibition in the developing inner ear. *Development*. 141:2313-2324.
- Pickles, J.O. 2001. The expression of fibroblast growth factors and their receptors in the embryonic and neonatal mouse inner ear. *Hearing research*. 155:54-62.

- Pickles, J.O., and B. Chir. 2002. Roles of fibroblast growth factors in the inner ear. *Audiology & neuro-otology*. 7:36-39.
- Pieper, M., K. Ahrens, E. Rink, A. Peter, and G. Schlosser. 2012. Differential distribution of competence for panplacodal and neural crest induction to non-neural and neural ectoderm. *Development*. 139:1175-1187.
- Plotnikov, A.N., S.R. Hubbard, J. Schlessinger, and M. Mohammadi. 2000. Crystal structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinants of ligand-receptor specificity. *Cell*. 101:413-424.
- Plotnikov, A.N., J. Schlessinger, S.R. Hubbard, and M. Mohammadi. 1999. Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell*. 98:641-650.
- Polo, J.M., E. Anderssen, R.M. Walsh, B.A. Schwarz, C.M. Nefzger, S.M. Lim, M. Borkent, E. Apostolou, S. Alaei, J. Cloutier, O. Bar-Nur, S. Cheloufi, M. Stadtfeld, M.E. Figueroa, D. Robinton, S. Natesan, A. Melnick, J. Zhu, S. Ramaswamy, and K. Hochedlinger. 2012. A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell*. 151:1617-1632.
- Polo, J.M., S. Liu, M.E. Figueroa, W. Kulalert, S. Eminli, K.Y. Tan, E. Apostolou, M. Stadtfeld, Y. Li, T. Shioda, S. Natesan, A.J. Wagers, A. Melnick, T. Evans, and K. Hochedlinger. 2010. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nature biotechnology*. 28:848-855.
- Pujol, R., and M. Lavigne-Rebillard. 1985. Early stages of innervation and sensory cell differentiation in the human fetal organ of Corti. *Acta Otolaryngol. Suppl.* 423:43-50.
- Pujol, R., and M. Lavigne-Rebillard. 1995. Sensory and neural structures in the developing human cochlea. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*. 32 Suppl:S177-182.
- Pujol, R., G. Zajic, D. Dulon, Y. Raphael, R.A. Altschuler, and J. Schacht. 1991. First appearance and development of motile properties in outer hair cells isolated from guinea-pig cochlea. *Hearing research*. 57:129-141.
- Pyle, A.D., L.F. Lock, and P.J. Donovan. 2006. Neurotrophins mediate human embryonic stem cell survival. *Nature biotechnology*. 24:344-350.
- Rajala, K., M. Pekkanen-Mattila, and K. Aalto-Setälä. 2011. Cardiac differentiation of pluripotent stem cells. *Stem cells international*. 2011:383709.
- Ran, F.A., P.D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D.A. Scott, and F. Zhang. 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*. 8:2281-2308.
- Raya, A., I. Rodriguez-Piza, G. Guenechea, R. Vassena, S. Navarro, M.J. Barrero, A. Consiglio, M. Castella, P. Rio, E. Sleep, F. Gonzalez, G. Tiscornia, E. Garreta, T. Aasen, A. Veiga, I.M. Verma, J. Surrallés, J. Bueren, and J.C. Izpisua Belmonte. 2009. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature*. 460:53-59.
- Reichert, S., R.A. Randall, and C.S. Hill. 2013. A BMP regulatory network controls ectodermal cell fate decisions at the neural plate border. *Development*. 140:4435-4444.
- Reik, W., W. Dean, and J. Walter. 2001. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science (New York, N.Y.)*. 293:1089-1093.
- Reinhardt, P., B. Schmid, L.F. Burbulla, D.C. Schondorf, L. Wagner, M. Glatza, S. Hoing, G. Hargus, S.A. Heck, A. Dhingra, G. Wu, S. Müller, K. Brockmann, T. Kluba, M. Maisel, R. Krüger, D. Berg, Y. Tsytsyura, C.S. Thiel, O.E. Psathaki, J. Klingauf, T. Kuhlmann, M. Klewin, H. Müller, T. Gasser, H.R. Scholer, and J. Sternecker. 2013. Genetic correction of a LRRK2 mutation in human iPSCs links parkinsonian neurodegeneration to ERK-dependent changes in gene expression. *Cell stem cell*. 12:354-367.

- Reubinoff, B.E., M.F. Pera, C.Y. Fong, A. Trounson, and A. Bongso. 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature biotechnology*. 18:399-404.
- Riccomagno, M.M., S. Takada, and D.J. Epstein. 2005. Wnt-dependent regulation of inner ear morphogenesis is balanced by the opposing and supporting roles of Shh. *Genes & development*. 19:1612-1623.
- Riento, K., N. Totty, P. Villalonga, R. Garg, R. Guasch, and A.J. Ridley. 2005. RhoE function is regulated by ROCK I-mediated phosphorylation. *The EMBO journal*. 24:1170-1180.
- Robertson, K.D., and P.A. Jones. 2000. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis*. 21:461-467.
- Robinton, D.A., and G.Q. Daley. 2012. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*. 481:295-305.
- Ronaghi, M., M. Nasr, M. Ealy, R. Durruthy-Durruthy, J. Waldhaus, G.H. Diaz, L.M. Joubert, K. Oshima, and S. Heller. 2014. Inner ear hair cell-like cells from human embryonic stem cells. *Stem cells and development*. 23:1275-1284.
- Rosner, M.H., M.A. Vigano, K. Ozato, P.M. Timmons, F. Poirier, P.W. Rigby, and L.M. Staudt. 1990. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature*. 345:686-692.
- Rossant, J. 2015. Mouse and human blastocyst-derived stem cells: vive les differences. *Development*. 142:9-12.
- Rouet, P., F. Smih, and M. Jasin. 1994. Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Molecular and cellular biology*. 14:8096-8106.
- Sai, X., and R.K. Ladher. 2015. Early steps in inner ear development: induction and morphogenesis of the otic placode. *Frontiers in pharmacology*. 6:19.
- Saint-Jeannet, J.P., and S.A. Moody. 2014. Establishing the pre-placodal region and breaking it into placodes with distinct identities. *Developmental biology*. 389:13-27.
- Samavarchi-Tehrani, P., A. Golipour, L. David, H.K. Sung, T.A. Beyer, A. Datti, K. Woltjen, A. Nagy, and J.L. Wrana. 2010. Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell stem cell*. 7:64-77.
- Satir, P., L.B. Pedersen, and S.T. Christensen. 2010. The primary cilium at a glance. *Journal of cell science*. 123:499-503.
- Sato, N., L. Meijer, L. Skaltsounis, P. Greengard, and A.H. Brivanlou. 2004. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nature medicine*. 10:55-63.
- Scharenberg, A.M., P. Duchateau, and J. Smith. 2013. Genome engineering with TAL-effector nucleases and alternative modular nuclease technologies. *Current gene therapy*. 13:291-303.
- Schimmang, T. 2007. Expression and functions of FGF ligands during early otic development. *The International journal of developmental biology*. 51:473-481.
- Schlaeger, T.M., L. Daheron, T.R. Brickler, S. Entwisle, K. Chan, A. Cianci, A. DeVine, A. Ettenger, K. Fitzgerald, M. Godfrey, D. Gupta, J. McPherson, P. Malwadkar, M. Gupta, B. Bell, A. Doi, N. Jung, X. Li, M.S. Lynes, E. Brookes, A.B. Cherry, D. Demirbas, A.M. Tsankov, L.I. Zon, L.L. Rubin, A.P. Feinberg, A. Meissner, C.A. Cowan, and G.Q. Daley. 2015. A comparison of non-integrating reprogramming methods. *Nature biotechnology*. 33:58-63.

- Schlessinger, J., A.N. Plotnikov, O.A. Ibrahimi, A.V. Eliseenkova, B.K. Yeh, A. Yayon, R.J. Linhardt, and M. Mohammadi. 2000. Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Molecular cell*. 6:743-750.
- Schlosser, G. 2006. Induction and specification of cranial placodes. *Developmental biology*. 294:303-351.
- Schlosser, G. 2007. How old genes make a new head: redeployment of Six and Eya genes during the evolution of vertebrate cranial placodes. *Integrative and comparative biology*. 47:343-359.
- Schlosser, G. 2014. Early embryonic specification of vertebrate cranial placodes. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology*. 3:349-363.
- Schrijver, I. 2004. Hereditary non-syndromic sensorineural hearing loss: transforming silence to sound. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 6:275-284.
- Sebastiano, V., M.L. Maeder, J.F. Angstman, B. Haddad, C. Khayter, D.T. Yeo, M.J. Goodwin, J.S. Hawkins, C.L. Ramirez, L.F. Batista, S.E. Artandi, M. Wernig, and J.K. Joung. 2011. In situ genetic correction of the sickle cell anemia mutation in human induced pluripotent stem cells using engineered zinc finger nucleases. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 29:1717-1726.
- Sekerkova, G., C.P. Richter, and J.R. Bartles. 2011. Roles of the espin actin-bundling proteins in the morphogenesis and stabilization of hair cell stereocilia revealed in CBA/CaJ congenic jerker mice. *PLoS genetics*. 7:e1002032.
- Self, T., M. Mahony, J. Fleming, J. Walsh, S.D. Brown, and K.P. Steel. 1998. Shaker-1 mutations reveal roles for myosin VIIA in both development and function of cochlear hair cells. *Development*. 125:557-566.
- Shaer, A., N. Azarpira, A. Vahdati, M.H. Karimi, and M. Shariati. 2015. Differentiation of human-induced pluripotent stem cells into insulin-producing clusters. *Experimental and clinical transplantation : official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation*. 13:68-75.
- Shah, T., and D. Swerdlow. 2010. Detecting, predicting and modifying cardiovascular risk: new and developing strategies. *Expert review of cardiovascular therapy*. 8:1519-1521.
- Shenje, L.T., P. Andersen, M.K. Halushka, C. Lui, L. Fernandez, G.B. Collin, N. Amat-Alarcon, W. Meschino, E. Cutz, K. Chang, R. Yonescu, D.A. Batista, Y. Chen, S. Chelko, J.E. Crosson, J. Scheel, L. Vricella, B.D. Craig, B.A. Marosy, D.W. Mohr, K.N. Hetrick, J.M. Romm, A.F. Scott, D. Valle, J.K. Naggert, C. Kwon, K.F. Doheny, and D.P. Judge. 2014. Mutations in Alstrom protein impair terminal differentiation of cardiomyocytes. *Nature communications*. 5:3416.
- Shi, F., C.E. Corrales, M.C. Liberman, and A.S. Edge. 2007. BMP4 induction of sensory neurons from human embryonic stem cells and reinnervation of sensory epithelium. *The European journal of neuroscience*. 26:3016-3023.
- Shi, Y., and J. Massague. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*. 113:685-700.
- Shin, S., M. Mitalipova, S. Noggle, D. Tibbitts, A. Venable, R. Rao, and S.L. Stice. 2006. Long-term proliferation of human embryonic stem cell-derived neuroepithelial cells using defined adherent culture conditions. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 24:125-138.
- Si-Tayeb, K., F.K. Noto, A. Sepac, F. Sedlic, Z.J. Bosnjak, J.W. Lough, and S.A. Duncan. 2010. Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient transfection of plasmid DNA encoding reprogramming factors. *BMC developmental biology*. 10:81.

- Singla, D.K., D.J. Schneider, M.M. LeWinter, and B.E. Sobel. 2006. wnt3a but not wnt11 supports self-renewal of embryonic stem cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 345:789-795.
- Singla, V., and J.F. Reiter. 2006. The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science (New York, N.Y.)*. 313:629-633.
- Slukvin, II. 2013. Hematopoietic specification from human pluripotent stem cells: current advances and challenges toward de novo generation of hematopoietic stem cells. *Blood*. 122:4035-4046.
- Smith, C., A. Gore, W. Yan, L. Abalde-Atristain, Z. Li, C. He, Y. Wang, R.A. Brodsky, K. Zhang, L. Cheng, and Z. Ye. 2014. Whole-genome sequencing analysis reveals high specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-based genome editing in human iPSCs. *Cell stem cell*. 15:12-13.
- Smith, J., S. Grizot, S. Arnould, A. Duclert, J.C. Epinat, P. Chames, J. Prieto, P. Redondo, F.J. Blanco, J. Bravo, G. Montoya, F. Paques, and P. Duchateau. 2006. A combinatorial approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic acids research*. 34:e149.
- Smithies, O., R.G. Gregg, S.S. Boggs, M.A. Koralewski, and R.S. Kucherlapati. 1985. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*. 317:230-234.
- Soldner, F., D. Hockemeyer, C. Beard, Q. Gao, G.W. Bell, E.G. Cook, G. Hargus, A. Blak, O. Cooper, M. Mitalipova, O. Isacson, and R. Jaenisch. 2009. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*. 136:964-977.
- Soldner, F., J. Laganieri, A.W. Cheng, D. Hockemeyer, Q. Gao, R. Alagappan, V. Khurana, L.I. Golbe, R.H. Myers, S. Lindquist, L. Zhang, D. Guschin, L.K. Fong, B.J. Vu, X. Meng, F.D. Urnov, E.J. Rebar, P.D. Gregory, H.S. Zhang, and R. Jaenisch. 2011. Generation of isogenic pluripotent stem cells differing exclusively at two early onset Parkinson point mutations. *Cell*. 146:318-331.
- Somers, A., J.C. Jean, C.A. Sommer, A. Omari, C.C. Ford, J.A. Mills, L. Ying, A.G. Sommer, J.M. Jean, B.W. Smith, R. Lafyatis, M.F. Demierre, D.J. Weiss, D.L. French, P. Gadue, G.J. Murphy, G. Mostoslavsky, and D.N. Kotton. 2010. Generation of transgene-free lung disease-specific human induced pluripotent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 28:1728-1740.
- Spalluto, C., D.I. Wilson, and T. Hearn. 2012. Nek2 localises to the distal portion of the mother centriole/basal body and is required for timely cilium disassembly at the G2/M transition. *European journal of cell biology*. 91:675-686.
- Spence, J.R., C.N. Mayhew, S.A. Rankin, M.F. Kuhar, J.E. Vallance, K. Tolle, E.E. Hoskins, V.V. Kalinichenko, S.I. Wells, A.M. Zorn, N.F. Shroyer, and J.M. Wells. 2011. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature*. 470:105-109.
- Spoendlin, H., and A. Schrott. 1988. The spiral ganglion and the innervation of the human organ of Corti. *Acta oto-laryngologica*. 105:403-410.
- Sridharan, R., J. Tchieu, M.J. Mason, R. Yachechko, E. Kuoy, S. Horvath, Q. Zhou, and K. Plath. 2009. Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell*. 136:364-377.

- Srsen, V., N. Gnad, A. Dammermann, and A. Merdes. 2006. Inhibition of centrosome protein assembly leads to p53-dependent exit from the cell cycle. *The Journal of cell biology*. 174:625-630.
- St Croix, B., C. Sheehan, J.W. Rak, V.A. Florenes, J.M. Slingerland, and R.S. Kerbel. 1998. E-Cadherin-dependent growth suppression is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(KIP1). *The Journal of cell biology*. 142:557-571.
- Stadtfeld, M., E. Apostolou, H. Akutsu, A. Fukuda, P. Follett, S. Natesan, T. Kono, T. Shioda, and K. Hochedlinger. 2010. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature*. 465:175-181.
- Stadtfeld, M., K. Brennand, and K. Hochedlinger. 2008a. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Current biology : CB*. 18:890-894.
- Stadtfeld, M., and K. Hochedlinger. 2010. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes & development*. 24:2239-2263.
- Stadtfeld, M., M. Nagaya, J. Utikal, G. Weir, and K. Hochedlinger. 2008b. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science (New York, N.Y.)*. 322:945-949.
- Stefkova, K., J. Prochazkova, and J. Pachernik. 2015. Alkaline phosphatase in stem cells. *Stem cells international*. 2015:628368.
- Stockinger, A., A. Eger, J. Wolf, H. Beug, and R. Foisner. 2001. E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent beta-catenin transcriptional activity. *The Journal of cell biology*. 154:1185-1196.
- Stoddard, B.L. 2011. Homing endonucleases: from microbial genetic invaders to reagents for targeted DNA modification. *Structure (London, England : 1993)*. 19:7-15.
- Stooke-Vaughan, G.A., P. Huang, K.L. Hammond, A.F. Schier, and T.T. Whitfield. 2012. The role of hair cells, cilia and ciliary motility in otolith formation in the zebrafish otic vesicle. *Development*. 139:1777-1787.
- Streit, A. 2008. The cranial sensory nervous system: specification of sensory progenitors and placodes. In *StemBook*. : 2008 Andrea Streit., Cambridge MA.
- Suh, M.R., Y. Lee, J.Y. Kim, S.K. Kim, S.H. Moon, J.Y. Lee, K.Y. Cha, H.M. Chung, H.S. Yoon, S.Y. Moon, V.N. Kim, and K.S. Kim. 2004. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Developmental biology*. 270:488-498.
- Sumi, T., N. Tsuneyoshi, N. Nakatsuji, and H. Suemori. 2007. Apoptosis and differentiation of human embryonic stem cells induced by sustained activation of c-Myc. *Oncogene*. 26:5564-5576.
- Sumi, T., N. Tsuneyoshi, N. Nakatsuji, and H. Suemori. 2008. Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt/beta-catenin, Activin/Nodal and BMP signaling. *Development*. 135:2969-2979.
- Sun, N., M. Yazawa, J. Liu, L. Han, V. Sanchez-Freire, O.J. Abilez, E.G. Navarrete, S. Hu, L. Wang, A. Lee, A. Pavlovic, S. Lin, R. Chen, R.J. Hajjar, M.P. Snyder, R.E. Dolmetsch, M.J. Butte, E.A. Ashley, M.T. Longaker, R.C. Robbins, and J.C. Wu. 2012. Patient-specific induced pluripotent stem cells as a model for familial dilated cardiomyopathy. *Science translational medicine*. 4:130ra147.
- Sun, N., and H. Zhao. 2013. Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): a highly efficient and versatile tool for genome editing. *Biotechnology and bioengineering*. 110:1811-1821.
- Suzuki, T., K. Yamamoto, H. Harashima, and H. Kamiya. 2008. Base excision repair enzyme endonuclease III suppresses mutagenesis caused by 8-hydroxy-dGTP. *DNA repair*. 7:88-94.

- Szarama, K.B., R. Stepanyan, R.S. Petralia, N. Gavara, G.I. Frolenkov, M.W. Kelley, and R.S. Chadwick. 2012. Fibroblast growth factor receptor 3 regulates microtubule formation and cell surface mechanical properties in the developing organ of Corti. *Bioarchitecture*. 2:214-219.
- Taapken, S.M., B.S. Nisler, M.A. Newton, T.L. Sampsell-Barron, K.A. Leonhard, E.M. McIntire, and K.D. Montgomery. 2011. Karotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Nature biotechnology*. 29:313-314.
- Tabar, V., and L. Studer. 2014. Pluripotent stem cells in regenerative medicine: challenges and recent progress. *Nature reviews. Genetics*. 15:82-92.
- Takahashi, K., K. Okita, M. Nakagawa, and S. Yamanaka. 2007. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nature protocols*. 2:3081-3089.
- Takahashi, K., and S. Yamanaka. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126:663-676.
- Takashima, Y., G. Guo, R. Loos, J. Nichols, G. Ficz, F. Krueger, D. Oxley, F. Santos, J. Clarke, W. Mansfield, W. Reik, P. Bertone, and A. Smith. 2014. Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human. *Cell*. 158:1254-1269.
- Takayama, K., K. Kawabata, Y. Nagamoto, K. Kishimoto, K. Tashiro, F. Sakurai, M. Tachibana, K. Kanda, T. Hayakawa, M.K. Furue, and H. Mizuguchi. 2013. 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials*. 34:1781-1789.
- Taranova, O.V., S.T. Magness, B.M. Fagan, Y. Wu, N. Surzenko, S.R. Hutton, and L.H. Pevny. 2006. SOX2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence. *Genes & development*. 20:1187-1202.
- Taylor, R.R., D.J. Jagger, S.R. Saeed, P. Axon, N. Donnelly, J. Tysome, D. Moffatt, R. Irving, P. Monksfield, C. Coulson, S.R. Freeman, S.K. Lloyd, and A. Forge. 2015. Characterizing human vestibular sensory epithelia for experimental studies: new hair bundles on old tissue and implications for therapeutic interventions in ageing. *Neurobiology of aging*. 36:2068-2084.
- Tekin, M., B.O. Hismi, S. Fitoz, H. Ozdag, F.B. Cengiz, A. Sirmaci, I. Aslan, B. Inceoglu, E.B. Yuksel-Konuk, S.T. Yilmaz, O. Yasun, and N. Akar. 2007. Homozygous mutations in fibroblast growth factor 3 are associated with a new form of syndromic deafness characterized by inner ear agenesis, microtia, and microdontia. *American journal of human genetics*. 80:338-344.
- Tesar, P.J., J.G. Chenoweth, F.A. Brook, T.J. Davies, E.P. Evans, D.L. Mack, R.L. Gardner, and R.D. McKay. 2007. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*. 448:196-199.
- Theunissen, T.W., B.E. Powell, H. Wang, M. Mitalipova, D.A. Faddah, J. Reddy, Z.P. Fan, D. Maetzel, K. Ganz, L. Shi, T. Lungjangwa, S. Imsoonthornruksa, Y. Stelzer, S. Rangarajan, A. D'Alessio, J. Zhang, Q. Gao, M.M. Dawlaty, R.A. Young, N.S. Gray, and R. Jaenisch. 2014. Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency. *Cell stem cell*. 15:471-487.
- Thomas, K.R., and M.R. Capecchi. 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell*. 51:503-512.
- Thomson, J.A., J. Itskovitz-Eldor, S.S. Shapiro, M.A. Waknitz, J.J. Swiergiel, V.S. Marshall, and J.M. Jones. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, N.Y.)*. 282:1145-1147.

- Tokusumi, T., A. Iida, T. Hirata, A. Kato, Y. Nagai, and M. Hasegawa. 2002. Recombinant Sendai viruses expressing different levels of a foreign reporter gene. *Virus research*. 86:33-38.
- Tona, Y., K. Hamaguchi, M. Ishikawa, T. Miyoshi, N. Yamamoto, K. Yamahara, J. Ito, and T. Nakagawa. 2014. Therapeutic potential of a gamma-secretase inhibitor for hearing restoration in a guinea pig model with noise-induced hearing loss. *BMC neuroscience*. 15:66.
- Tong, M., Z. Lv, L. Liu, H. Zhu, Q.Y. Zheng, X.Y. Zhao, W. Li, Y.B. Wu, H.J. Zhang, H.J. Wu, Z.K. Li, F. Zeng, L. Wang, X.J. Wang, J.H. Sha, and Q. Zhou. 2011. Mice generated from tetraploid complementation competent iPS cells show similar developmental features as those from ES cells but are prone to tumorigenesis. *Cell research*. 21:1634-1637.
- Torres, M., E. Gomez-Pardo, and P. Gruss. 1996. Pax2 contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory. *Development*. 122:3381-3391.
- Uchikawa, M., Y. Kamachi, and H. Kondoh. 1999. Two distinct subgroups of Group B Sox genes for transcriptional activators and repressors: their expression during embryonic organogenesis of the chicken. *Mech. Dev.* 84:103-120.
- Ullmann, U., C. Gilles, M. De Rycke, H. Van de Velde, K. Sermon, and I. Liebaers. 2008. GSK-3-specific inhibitor-supplemented hESC medium prevents the epithelial-mesenchymal transition process and the up-regulation of matrix metalloproteinases in hESCs cultured in feeder-free conditions. *Molecular human reproduction*. 14:169-179.
- Urnov, F.D., E.J. Rebar, M.C. Holmes, H.S. Zhang, and P.D. Gregory. 2010. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature reviews. Genetics*. 11:636-646.
- Utikal, J., J.M. Polo, M. Stadtfeld, N. Maherali, W. Kulalart, R.M. Walsh, A. Khalil, J.G. Rheinwald, and K. Hochedlinger. 2009. Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature*. 460:1145-1148.
- Vallier, L., and R.A. Pedersen. 2005. Human embryonic stem cells: an in vitro model to study mechanisms controlling pluripotency in early mammalian development. *Stem cell reviews*. 1:119-130.
- Vallier, L., T. Touboul, S. Brown, C. Cho, B. Bilican, M. Alexander, J. Cedervall, S. Chandran, L. Ahrlund-Richter, A. Weber, and R.A. Pedersen. 2009. Signaling pathways controlling pluripotency and early cell fate decisions of human induced pluripotent stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 27:2655-2666.
- Van Laer, L., K. Cryns, R.J. Smith, and G. Van Camp. 2003. Nonsyndromic hearing loss. *Ear and hearing*. 24:275-288.
- Vendrell, V., E. Carnicero, F. Giraldez, M.T. Alonso, and T. Schimmang. 2000. Induction of inner ear fate by FGF3. *Development*. 127:2011-2019.
- Veres, A., B.S. Gosis, Q. Ding, R. Collins, A. Ragavendran, H. Brand, S. Erdin, C.A. Cowan, M.E. Talkowski, and K. Musunuru. 2014. Low incidence of off-target mutations in individual CRISPR-Cas9 and TALEN targeted human stem cell clones detected by whole-genome sequencing. *Cell stem cell*. 15:27-30.
- Vestergaard, M.L., A. Awan, C.B. Warzecha, S.T. Christensen, and C.Y. Andersen. 2016. Immunofluorescence Microscopy and mRNA Analysis of Human Embryonic Stem Cells (hESCs) Including Primary Cilia Associated Signaling Pathways. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 1307:123-140.
- Wang, P., R.S. Eshaq, C.K. Meshul, C. Moore, R.L. Hood, and N.J. Leidenheimer. 2015. Neuronal gamma-aminobutyric acid (GABA) type A receptors undergo cognate ligand

- chaperoning in the endoplasmic reticulum by endogenous GABA. *Frontiers in cellular neuroscience*. 9:188.
- Wang, S., Y. Luo, P.D. Wilson, G.B. Witman, and J. Zhou. 2004. The autosomal recessive polycystic kidney disease protein is localized to primary cilia, with concentration in the basal body area. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 15:592-602.
- Wang, X., and J. Dai. 2010. Concise review: isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 28:885-893.
- Wang, Y., S. Baskerville, A. Shenoy, J.E. Babiarz, L. Baehner, and R. Blelloch. 2008. Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nature genetics*. 40:1478-1483.
- Wang, Y., P. Ji, J. Liu, R.R. Broaddus, F. Xue, and W. Zhang. 2009. Centrosome-associated regulators of the G(2)/M checkpoint as targets for cancer therapy. *Molecular cancer*. 8:8.
- Wang, Z., E. Oron, B. Nelson, S. Razis, and N. Ivanova. 2012. Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells. *Cell stem cell*. 10:440-454.
- Ware, C.B., A.M. Nelson, B. Mecham, J. Hesson, W. Zhou, E.C. Jonlin, A.J. Jimenez-Caliani, X. Deng, C. Cavanaugh, S. Cook, P.J. Tesar, J. Okada, L. Margaretha, H. Sperber, M. Choi, C.A. Blau, P.M. Treuting, R.D. Hawkins, V. Cirulli, and H. Ruohola-Baker. 2014. Derivation of naive human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111:4484-4489.
- Warren, L., P.D. Manos, T. Ahfeldt, Y.H. Loh, H. Li, F. Lau, W. Ebina, P.K. Mandal, Z.D. Smith, A. Meissner, G.Q. Daley, A.S. Brack, J.J. Collins, C. Cowan, T.M. Schlaeger, and D.J. Rossi. 2010. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell stem cell*. 7:618-630.
- Watanabe, K., M. Ueno, D. Kamiya, A. Nishiyama, M. Matsumura, T. Wataya, J.B. Takahashi, S. Nishikawa, K. Muguruma, and Y. Sasai. 2007. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*. 25:681-686.
- Wernig, M., A. Meissner, J.P. Cassady, and R. Jaenisch. 2008. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell stem cell*. 2:10-12.
- Western, P., J. Maldonado-Saldivia, J. van den Bergen, P. Hajkova, M. Saitou, S. Barton, and M.A. Surani. 2005. Analysis of Esg1 expression in pluripotent cells and the germline reveals similarities with Oct4 and Sox2 and differences between human pluripotent cell lines. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 23:1436-1442.
- Whitfield, T.T. 2015. Development of the inner ear. *Current opinion in genetics & development*. 32:112-118.
- Wilmut, I., A.E. Schnieke, J. McWhir, A.J. Kind, and K.H. Campbell. 2007. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Cloning and stem cells*. 9:3-7.
- Wilson, P.D. 2004. Polycystic kidney disease: new understanding in the pathogenesis. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 36:1868-1873.
- Woltjen, K., I.P. Michael, P. Mohseni, R. Desai, M. Mileikovsky, R. Hamalainen, R. Cowling, W. Wang, P. Liu, M. Gertsenstein, K. Kaji, H.K. Sung, and A. Nagy. 2009. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*. 458:766-770.
- Wright, W.E., M.A. Piatyszek, W.E. Rainey, W. Byrd, and J.W. Shay. 1996. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Developmental genetics*. 18:173-179.

- Xiao, L., X. Yuan, and S.J. Sharkis. 2006. Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 24:1476-1486.
- Xu, R.H., R.M. Peck, D.S. Li, X. Feng, T. Ludwig, and J.A. Thomson. 2005. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nature methods*. 2:185-190.
- Yajima, H., M. Suzuki, H. Ochi, K. Ikeda, S. Sato, K. Yamamura, H. Ogino, N. Ueno, and K. Kawakami. 2014. Six1 is a key regulator of the developmental and evolutionary architecture of sensory neurons in craniates. *BMC biology*. 12:40.
- Yamanaka, S. 2009a. Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature*. 460:49-52.
- Yamanaka, S. 2009b. A fresh look at iPS cells. *Cell*. 137:13-17.
- Yamashita, A., T. Takada, J. Narita, G. Yamamoto, and R. Torii. 2005. Osteoblastic differentiation of monkey embryonic stem cells in vitro. *Cloning and stem cells*. 7:232-237.
- Ye, L., S. Zhang, L. Greder, J. Dutton, S.A. Keirstead, M. Lepley, L. Zhang, D. Kaufman, and J. Zhang. 2013. Effective cardiac myocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells requires VEGF. *PloS one*. 8:e53764.
- Ye, Z., H. Zhan, P. Mali, S. Dowey, D.M. Williams, Y.Y. Jang, C.V. Dang, J.L. Spivak, A.R. Moliterno, and L. Cheng. 2009. Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders. *Blood*. 114:5473-5480.
- Young, A., J.B. Dichtenberg, A. Purohit, R. Tuft, and S.J. Doxsey. 2000. Cytoplasmic dynein-mediated assembly of pericentrin and gamma tubulin onto centrosomes. *Molecular biology of the cell*. 11:2047-2056.
- Yu, C., Y. Liu, T. Ma, K. Liu, S. Xu, Y. Zhang, H. Liu, M. La Russa, M. Xie, S. Ding, and L.S. Qi. 2015. Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells. *Cell stem cell*. 16:142-147.
- Yu, J., K. Hu, K. Smuga-Otto, S. Tian, R. Stewart, Slukvin, II, and J.A. Thomson. 2009. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science (New York, N.Y.)*. 324:797-801.
- Yu, J., M.A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J.L. Frane, S. Tian, J. Nie, G.A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, Slukvin, II, and J.A. Thomson. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science (New York, N.Y.)*. 318:1917-1920.
- Yu, Y., H. Liu, Y. Ikeda, B.P. Amiot, P. Rinaldo, S.A. Duncan, and S.L. Nyberg. 2012. Hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells: relevance to cellular therapies. *Stem cell research*. 9:196-207.
- Yusa, K., S.T. Rashid, H. Strick-Marchand, I. Varela, P.Q. Liu, D.E. Paschon, E. Miranda, A. Ordonez, N.R. Hannan, F.J. Rouhani, S. Darche, G. Alexander, S.J. Marciniak, N. Fusaki, M. Hasegawa, M.C. Holmes, J.P. Di Santo, D.A. Lomas, A. Bradley, and L. Vallier. 2011. Targeted gene correction of alpha1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature*. 478:391-394.
- Zappone, M.V., R. Galli, R. Catena, N. Meani, S. De Biasi, E. Mattei, C. Tiveron, A.L. Vescovi, R. Lovell-Badge, S. Ottolenghi, and S.K. Nicolis. 2000. Sox2 regulatory sequences direct expression of a (beta)-geo transgene to telencephalic neural stem cells and precursors of the mouse embryo, revealing regionalization of gene expression in CNS stem cells. *Development*. 127:2367-2382.

- Zhang, P., J. Li, Z. Tan, C. Wang, T. Liu, L. Chen, J. Yong, W. Jiang, X. Sun, L. Du, M. Ding, and H. Deng. 2008. Short-term BMP-4 treatment initiates mesoderm induction in human embryonic stem cells. *Blood*. 111:1933-1941.
- Zhao, X.Y., W. Li, Z. Lv, L. Liu, M. Tong, T. Hai, J. Hao, C.L. Guo, Q.W. Ma, L. Wang, F. Zeng, and Q. Zhou. 2009. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*. 461:86-90.
- Zheng, J.L., C. Helbig, and W.Q. Gao. 1997. Induction of cell proliferation by fibroblast and insulin-like growth factors in pure rat inner ear epithelial cell cultures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 17:216-226.
- Zhou, J., P. Su, D. Li, S. Tsang, E. Duan, and F. Wang. 2010. High-efficiency induction of neural conversion in human ESCs and human induced pluripotent stem cells with a single chemical inhibitor of transforming growth factor beta superfamily receptors. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 28:1741-1750.
- Zhou, W., and C.R. Freed. 2009. Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 27:2667-2674.
- Zhou, Y., Y.P. Ching, R.W. Ng, and D.Y. Jin. 2003. Differential expression, localization and activity of two alternatively spliced isoforms of human APC regulator CDH1. *The Biochemical journal*. 374:349-358.
- Zimmerman, W.C., J. Sillibourne, J. Rosa, and S.J. Doxsey. 2004. Mitosis-specific anchoring of gamma tubulin complexes by pericentrin controls spindle organization and mitotic entry. *Molecular biology of the cell*. 15:3642-3657.
- Zine, A. 2001. Hes1 and Hes5 activities are required for the normal development of the hair cells in the mammalian inner ear. *J. Neurosci*. 21:4712-4720.
- Zou, C., J. Li, Y. Bai, W.T. Gunning, D.E. Wazer, V. Band, and Q. Gao. 2005. Centrobin: a novel daughter centriole-associated protein that is required for centriole duplication. *The Journal of cell biology*. 171:437-445.
- Zou, J., C.L. Sweeney, B.K. Chou, U. Choi, J. Pan, H. Wang, S.N. Dowey, L. Cheng, and H.L. Malech. 2011. Oxidase-deficient neutrophils from X-linked chronic granulomatous disease iPS cells: functional correction by zinc finger nuclease-mediated safe harbor targeting. *Blood*. 117:5561-5572.
- Zulato, E., F. Favaretto, C. Veronese, S. Campanaro, J.D. Marshall, S. Romano, A. Cabrelle, G.B. Collin, B. Zavan, A.S. Belloni, E. Rampazzo, J.K. Naggert, G. Abatangelo, N. Sicolo, P. Maffei, G. Milan, and R. Vettor. 2011. ALMS1-deficient fibroblasts over-express extra-cellular matrix components, display cell cycle delay and are resistant to apoptosis. *PloS one*. 6:e19081.
- Zwaka, T.P., and J.A. Thomson. 2003. Homologous recombination in human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*. 21:319-321.

ANNEXES

TABLES

Tables des Figures

FIGURE 1: DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE PRÉCOCE	19
FIGURE 2: ORIGINE DES MES, MEPISC ET HES	20
FIGURE 3 : MORPHOLOGIE CARACTÉRISTIQUE D'UNE COLONIE DE CELLULES HES SUR UN TAPIS DE CELLULES MEFS NOURRICIÈRES	22
FIGURE 4: STRATÉGIES DE DIFFÉRENCIATION DANS LES PRINCIPALES VOIES ECTODERMALES	24
FIGURE 5: STRATÉGIES DE DIFFÉRENCIATION DANS LES PRINCIPALES VOIES MÉSODERMALES	25
FIGURE 6: STRATÉGIES DE DIFFÉRENCIATION DANS LES PRINCIPALES VOIES ENDODERMALES	26
FIGURE 7: RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE LA PLURIPOTENCE DES CELLULES HES	30
FIGURE 8: RÉGULATION DE LA PLURIPOTENCE DES HES PAR LES MICROS-ARNS	31
FIGURE 9: VOIE DE SIGNALISATION WNT/B-CATÉLINE	32
FIGURE 10: VOIE DE SIGNALISATION TGFβETA/SMAD	33
FIGURE 11: VOIE DE SIGNALISATION DES FGFS	35
FIGURE 12: VOIE DES RHO-GTPASES ET LA DISSOCIATION DES CELLULES HES	37
FIGURE 13: REPROGRAMMATION NATURELLE OBSERVÉE PENDANT LE DÉVELOPPEMENT PRÉIMPLANTATOIRE PRÉCOCE	38
FIGURE 14: REPROGRAMMATION NATURELLE DES CELLULES GERMINALES	39
FIGURE 15: HISTORIQUE DE LA REPROGRAMMATION ARTIFICIELLE	40
FIGURE 16: RÔLE TRANSCRIPTIONNEL DES FACTEURS DE REPROGRAMMATION (OSKM) ET NANOG DANS LE RÉSEAU DE PLURIPOTENCE	42
FIGURE 17: CHANGEMENTS ÉPIGÉNÉTIQUES ET CELLULAIRES OBSERVÉS DURANT LA REPROGRAMMATION DE FIBROBLASTES EN CELLULES HIPS	47
FIGURE 18: INDUCTION DE L'APOPTOSE ET L'ARRÊT DU CYCLE CELLULAIRE LORS DE LA REPROGRAMMATION	48
FIGURE 19: CHALLENGES ET APPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES DES CELLULES HIPS	51
FIGURE 20: LE SYSTÈME DE DÉFENSE ADAPTATIF CRISPR DES BACTÉRIES	56
FIGURE 21: LE SYSTÈME CRISPR/CAS ADAPTÉ AUX CELLULES EUCARYOTES	57
FIGURE 22: LES MACHINERIES DE RÉPARATION ENDOGÈNES INDUITES PAR LA CDB	59
FIGURE 23: LA CAS9 NICKASE	61
FIGURE 24: ORGANISATION DE L'OREILLE INTERNE	62
FIGURE 25: L'INDUCTION OTIQUE DÉBUTE AUX ALENTOURS DE LA 2 ^{ÈME} SEMAINE POST FÉCONDATION CHEZ L'HOMME	64
FIGURE 26: LE DÉVELOPPEMENT TARDIF DE L'ORGANE DE CORTI	67
FIGURE 27: LA SIGNALISATION NOTCH DANS LE DÉVELOPPEMENT DES CELLULES CILIÉES ET CELLULES DE SOUTIEN	69
FIGURE 28: DÉVELOPPEMENT DU KINOCILIUM ET DES STÉRÉOCILS À LA SURFACE APICALE DES CELLULES CILIÉES	69

FIGURE 29: LES DIFFÉRENTS TYPES DE CELLULES DE SOUTIEN	70
FIGURE 30: LE GÈNE ET LA PROTÉINE ALMS1 ET SES DIFFÉRENTS DOMAINES	79
FIGURE 31 : LE CENTROSOME ET LE CYCLE CELLULAIRE	80
FIGURE 32 : PROTOCOLE DE GÉNÉRATION DES HIPS.	88
FIGURE 33 : LES DIFFÉRENTES ÉTAPES DU PROTOCOLE DE DIFFÉRENTIATION.	90
FIGURE 34 : LE GÈNE ALMS1 HUMAIN EST COMPOSÉ DE 12 928PB ET 23 EXONS	99
FIGURE 35: REPROGRAMMATION DES FIBROBLASTES DU PATIENT PT2 EN CELLULES HIPS ALMS	99
FIGURE 36: DÉGRADATION DES PARTICULES DU VIRUS SENDAÏ PRÉSENTES DANS LES HIPS ALMS	100
FIGURE 37: VALIDATION DES HIPS ALMS	102
FIGURE 38: VALIDATION DE LA PLURIPOTENCE DES HIPS ALMS	104
FIGURE 39: LA PROTÉINE ALMS1 N'EST PAS DÉTECTÉE DANS LES HIPS ALMS	105
FIGURE 40: SÉPARATION ANORMALE DES CENTROSOMES DANS LES HIPS ALMS.	106
FIGURE 41: CORRECTION DE LA MUTATION PONCTUELLE DES HIPS ALMS PAR LA TECHNIQUE D'ÉDITION DU GÉNOME (CRISPR/CAS9) ET GÉNÉRATION D'UNE LIGNÉE HIPS ISOGÉNIQUE CORRIGÉE POUR CETTE MUTATION	106
FIGURE 42: CONSTRUCTION DES DIFFÉRENTS ÉLÉMENTS DU CRISPR/CAS9	107
FIGURE 43: TEST DE LA FONCTIONNALITÉ DU COMPLEXE CAS9/ARNG PAR DIGESTION T7E1	108
FIGURE 44: RÉSUMÉ DE LA STRATÉGIE UTILISÉE POUR LA CORRECTION DE LA MUTATION DES HIPS ALMS PAR CRISPR/CAS9	110
FIGURE 45: EFFICACITÉ DE LA CORRECTION DU GÈNE ALMS1 PAR CRISPR/CAS9	111
FIGURE 46: ANALYSE PAR SÉQUENÇAGE DES COLONIES HIPS ISOGÉNIQUES PARTIELLEMENT CORRIGÉES	111
FIGURE 47: LA CORRECTION PARTIELLE DE LA MUTATION RESTAURE L'EXPRESSION DE LA PROTÉINE ALMS1 DANS LES CELLULES HIPS ISOGÉNIQUES	112
FIGURE 48: VALIDATION DE LA PLURIPOTENCE ET DE L'INTÉGRITÉ GÉNOMIQUE DES HIPS ISOGÉNIQUES	114
FIGURE 49: LES PROGÉNITEURS OTIQUES PAX2 POSITIFS SONT INDUITS DE J9 À J20 EN PRÉSENCE D'HS ET DE FGF2	116
FIGURE 50: CARACTÉRISATION DES PROGÉNITEURS OTIQUES WT À J9 ET J20	118
FIGURE 51: LE FGF2 INDUIT SPÉCIFIQUEMENT LES PROGÉNITEURS OTIQUES	118
FIGURE 52: OBTENTION D'UNE POPULATION HOMOGÈNE D'HOSCS APRÈS LE PASSAGE EN CONDITION « HOSCS » À J20	120
FIGURE 53: COMPARAISON DU PROFIL D'EXPRESSION DES HOSCS ET DES HNSCS	121
FIGURE 54: STRATÉGIE UTILISÉE POUR LA DIFFÉRENCIATION TERMINALE DES HOSCS WT EN CELLULES CILIÉES WT.	122
FIGURE 55: LES HOSCS WT SONT CAPABLES DE SE DIFFÉRENCIER, APRÈS 10 JOURS DE CO-CULTURE <i>IN VITRO</i> , EN CELLULES AYANT UN PROFIL D'EXPRESSION CARACTÉRISTIQUES DE CELLULES CILIÉES	123

FIGURE 56: LE FLUOROCHROME FM1-43, VISUALISÉ EN TEMPS RÉEL	124
FIGURE 57: DIFFÉRENTS STADES DE DIFFÉRENCIATION ÉTUDIÉS : JO OU HIPS, PROGÉNITEURS OTIQUES OU HOSCS ET CELLULES CILIÉES DIFFÉRENCIÉES APRÈS 10 JOURS DE CO-CULTURE	124
FIGURE 58: INDUCTION DES PROGÉNITEURS OTIQUES ALMS À PARTIR DES CELLULES HIPS ALMS	126
FIGURE 59: GÉNÉRATION DES HOSCS ALMS	127
FIGURE 60 : DIFFÉRENCIATION TERMINALE DES HOSCS ALMS EN CELLULES CILIÉES PATHOLOGIQUES APRÈS 10 JOURS DE CO-CULTURE	128
FIGURE 61: ETUDE DE LA PROLIFÉRATION DES CELLULES HIPS ALMS	131
FIGURE 62: ETUDE DE LA PROLIFÉRATION AU STADE PROGÉNITEUR	132
FIGURE 63: ETUDE DE LA PROLIFÉRATION DES CELLULES HUMAINES DIFFÉRENCIÉES APRÈS 10 JOURS DE CO- CULTURE	134
FIGURE 64 : ETUDE DE LA CILIOGÈNE AU STADE PROGÉNITEUR APRÈS 48H SANS FACTEURS DE CROISSANCE	135
FIGURE 65: MODÈLE DÉVELOPPÉ PAR KNORZ <i>ET AL.</i>	146
FIGURE 66: DÉFAUTS DU CYCLE CELLULAIRE DES HIPS ALMS ET HYPOTHÈSES DE TRAVAIL	147
FIGURE 67: PERTURBATIONS DU CYCLE CELLULAIRE ET DE LA CILIOGÈNE DES HOSCS ALMS ET HYPOTHÈSES DE TRAVAIL	151

Liste des Tableaux

TABLEAU 1: MÉTHODES DE REPROGRAMMATION EN CELLULES HIPS.	44
TABLEAU 2: GÉNÉRATION DE CELLULES HIPS ISOGÉNIQUES PAR L'UTILISATION DU CRISPR/CAS.	62
TABLEAU 3: LES PROTOCOLES DE DIFFÉRENCIATION DE CELLULES MES, HES ET HIPS EN CELLULES COCHLÉAIRES	72
TABLEAU 4 : LISTE DES AMORCES DE QRT-PCR UTILISÉES AU COURS DE CE TRAVAIL.	92
TABLEAU 5 : LISTE DES ANTICORPS PRIMAIRES UTILISÉS AU COURS DE CE TRAVAIL.	93
TABLEAU 6 : OLIGOS UTILISÉS POUR LA CONSTRUCTION DE L'ARNG#1	96