

UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE

ECOLE DOCTORALE 62 « Sciences de la Vie et de la Santé »

LABORATOIRE DE NEUROSCIENCES INTEGRATIVES ET ADAPTATIVES
UMR 7260 CNRS/AMU

THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE

Discipline : Sciences de la Vie

Spécialité : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement par :

Hanae LAHLOU

Génération de progéniteurs otiques dérivés de cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC) : application à la thérapie cellulaire dans l'oreille interne

Soutenue le 09/10/2017 devant le jury :

Prof. François FERON	Université d'Aix-Marseille	Président/Examineur
Prof. John DEVOS	CHU de Montpellier	Rapporteur
Prof. Christelle MONVILLE	Université Evry Val Essonne	Rapportrice
Prof. Azel ZINE	Université Montpellier I	Directeur de thèse

Résumé

Les troubles auditifs représentent un problème majeur de santé publique. La France compte plus de 8 millions de personnes souffrant d'une surdité modérée, sévère ou profonde. Selon l'endroit de la lésion, on distingue deux types de déficiences auditives : la surdité de transmission, liée à une affection de l'oreille externe ou moyenne, et la surdité de perception (ou neurosensorielle), en général liée à une atteinte de l'oreille interne. Sur le plan physiopathologique, la plupart des surdités neurosensorielles résulte d'une perte de cellules ciliées (CC), cellules responsables de la mécano-transduction des sons. Chez les mammifères, ce processus est malheureusement irréversible. Le développement de la thérapie cellulaire a fait naître de nouveaux espoirs pour le traitement des surdités neurosensorielles. Les cellules souches d'origine embryonnaire ou adulte seraient capables de se différencier *in vitro* en progéniteurs otiques et de restaurer partiellement les fonctions auditives *in vivo* après transplantation. Cependant, les protocoles de différenciation *in vitro* des CC à partir de cellules souches sont insatisfaisants, et les signaux qui contrôlent ce phénomène restent mal connus.

Ainsi, l'objectif de ce travail de thèse était d'étudier *in vitro* la différenciation des CC à partir de cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC). Nous nous sommes intéressés à deux voies de signalisation majeures impliquées dans le développement de l'oreille interne *in vivo*, la voie Notch et la voie Wnt. Dans une première partie, nous avons montré que l'inhibition tardive de la voie Notch favorise la différenciation des hiPSC en CC. Dans une seconde partie, nous avons étudié le rôle de la voie Wnt dans la différenciation des hiPSC en cellules otiques. Nos résultats indiquent que l'inhibition de la voie Wnt durant la première phase d'induction favorise l'expression des marqueurs de la placode otique et initie la spécification des CC.

Les travaux présentés dans cette thèse améliorent ainsi les protocoles de différenciation des hiPSC et suggèrent que ce type de cellules serait parfaitement adapté pour traiter les surdités neurosensorielles.

Mots clés : *surdité neurosensorielle, hiPSC, différenciation otique, progéniteurs otique, cellules ciliées.*

Abstract

Hearing impairments are a major public health problem. In France, over 8 million people suffer from moderate or profound deafness. Depending on the location of the lesion, we distinguish two types of hearing loss: conductive hearing loss, related to an affection of the outer or middle ear, and neurosensory hearing loss, often associated to inner ear disorders and degeneration of hair cells (HCs), highly specialized cells responsible for the perception of sounds. Unfortunately, this process is irreversible in mammals. Currently, no curative treatment allows these cells to regenerate. For this reason, the development of cell therapy arose new hopes for the treatment of neurosensory hearing loss. Stem cells, either of embryonic or adult origin, seem able to differentiate *in vitro* into otic progenitors and to partially restore auditory functions *in vivo*. However, current protocols for *in vitro* differentiation of stem cells into HCs are unsatisfactory, and the signals that control this phenomenon remain poorly understood. Thus, the objective of this thesis was to study *in vitro* HC differentiation from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). We were particularly interested in two major signaling pathways involved *in vivo* in inner ear development, the Notch and Wnt signaling pathways.

In a first part, we demonstrated that Notch inhibition during late otic differentiation enhances hiPSC differentiation into hair cell-like cells. In a second part, we studied the role of the Wnt signaling pathway during otic induction and HC specification. Our results indicate that Wnt inhibition during early otic induction promotes the expression of otic placode markers and initiate HC specification. The work presented here thus propose improved protocols to obtain HCs from hiPSCs, and suggest that this cell type is perfectly adapted for the treatment of neurosensory hearing loss.

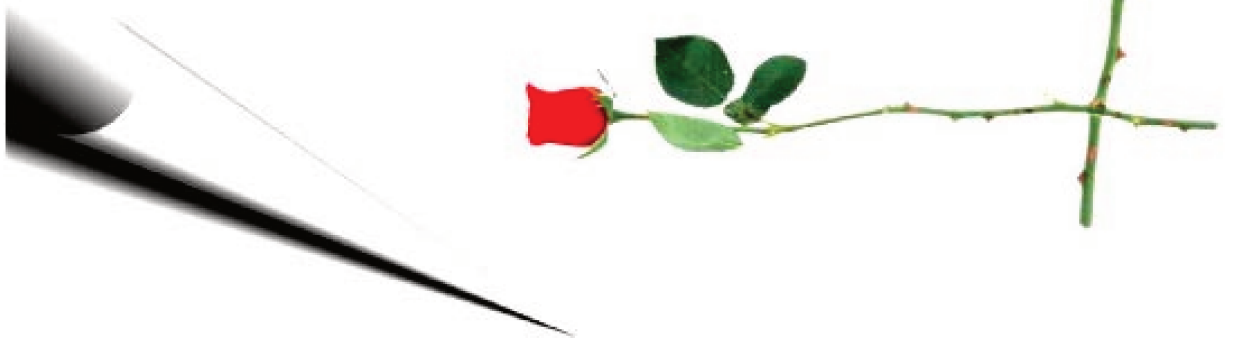
Key words: *neurosensory hearing loss, hiPSCs, otic differentiation, otic progenitors, hair cells.*

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut ...

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude,

L'amour, le respect, la reconnaissance...

Aussi simplement que



*Je dédie cette
thèse...*

À ma chère maman

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect et mon amour envers vous. Rien au monde ne pourrait compenser tous les sacrifices et les efforts que vous avez consentis pour mon éducation et mon bien-être depuis mon enfance, j'espère que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Puisse Dieu vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

À mon cher époux

Aucune expression ne saurait exprimer mes sentiments d'amour et de gratitude. Merci énormément pour ton soutien, tes encouragements, pour ton grand cœur, toutes les qualités qui seraient trop longues à énumérer. Tu m'as assistée dans les moments difficiles et tu m'as prise doucement par la main pour traverser ensemble des épreuves pénibles. Ma vie ne serait pas aussi agréable sans ta présence et ton amour.

À mes chères adorables sœurs

Aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous, votre joie et votre gaieté me comblent de bonheur, ma vie n'aurait aucun sens sans vous. Puisse Dieu vous garder, éclairer votre route et vous aider à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers.

À toute ma famille et mes amis

Qu'ils trouvent ici l'expression de mon profond amour, je vous remercie pour votre soutien, vous étiez toujours présents pendant mes moments de faiblesse.

À tous ceux qui m'ont aidée et soutenue dans la préparation de ce projet en particulier Isabelle VIRARD,

Ma conseillère et amie fidèle, je te suis très reconnaissante, et je ne te remercierai jamais assez pour ton amabilité, ta générosité, ton aide précieuse.

Remerciements

Rêvant depuis toujours de neurologie, je n'ai pas pu rejoindre la faculté de médecine, donc, sans trop m'éloigner de mon rêve, j'ai décidé de m'inscrire à la faculté des sciences pour étudier la biologie. Ainsi, j'ai obtenu ma licence puis deux masters, l'un spécialisé et l'autre de recherche, qui m'ont ouvert les portes vers d'autres perspectives. De plus en plus, j'admirais le monde de la recherche via mes stages de masters, ce qui a augmenté ma soif et mon envie d'apprendre encore plus, en particulier dans le domaine des cellules souches et les maladies neurodégénératives. Ainsi, j'ai décidé de faire une thèse en neurosciences, un domaine qui me passionnait depuis toujours, et voilà mon rêve qui devient une réalité. À l'issue de cette étape importante qu'est la thèse, je tiens à remercier un certain nombre de personnes qui ont fait de cette extraordinaire aventure scientifique, une magnifique aventure humaine.

Tout d'abord, je tiens à remercier le **Professeur Azel ZINE** de m'avoir acceptée en thèse et donné cette chance de faire partie de ce grand projet européen. Je le remercie également de la liberté qu'il m'a laissée dans la conduite de mes recherches, me permettant même de prendre des décisions risquées. Merci de n'avoir jamais cessé de croire en moi et à l'aboutissement de mes travaux, même dans les grosses périodes de doute. Grâce à votre confiance, j'ai pu développer plusieurs qualités qui m'ont permis de mûrir et de développer mes connaissances scientifiques. Malgré les moments difficiles, ce projet n'a fait qu'augmenter ma passion pour la recherche.

Je tiens également à remercier les **Professeurs John DEVOS et Christelle MONVILLE** qui ont consenti à apporter leur expertise pour l'évaluation de ce travail et me font l'honneur de leur présence dans ce jury de thèse.

J'adresse mes vifs remerciements au **Professeur François FERON**, d'abord, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, ensuite pour son soutien et sa disponibilité tout au long de ces années depuis mon master 1. J'ai toujours apprécié votre soif et votre passion pour la recherche, ce qui m'a encouragée à continuer dans ce domaine. Votre enthousiasme ainsi que votre optimisme ont su instaurer en moi un engouement grandissant pour les neurosciences en général et les cellules souches en particulier.

Je remercie aussi le **Dr Michel KHRESTCHATISKY** pour m'avoir autorisée à conduire mes recherches au sein de son laboratoire et pour m'avoir donné la chance de travailler dans un environnement de recherche stimulant et favorable aux échanges scientifiques.

Je ne saurais trouver les mots pour exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance au **Dr Emmanuelle NIVET** pour l'aide qu'il m'a apportée durant toutes ces années de thèse. Merci pour ta gentillesse et pour m'avoir prise sous ton aile durant mes débuts en culture de cellules souches, alors que tu avais d'autres projets à gérer. J'ai eu l'honneur et le grand privilège de bénéficier de tes connaissances. Je ne te remercierai jamais assez pour ton soutien et ta disponibilité du premier jour jusqu'à la dernière ligne droite de ma thèse ; ils m'ont été très précieux et je t'en suis extrêmement reconnaissante.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au **Dr Isabelle VIRARD** pour son soutien et son réconfort tout au long de ces années de thèse, surtout pour la dernière ligne droite, particulièrement mouvementée. Merci de m'avoir encouragée, mais surtout supportée. Tu étais toujours présente aux moments difficiles, je te remercie pour ta confiance, ton amitié, tes conseils et ton esprit d'analyse qui m'ont été d'un grand apport. Merci pour ta générosité, ta modestie et ta gentillesse, qui m'ont toujours impressionnée. Tu as su me transmettre ta passion et ton amour pour la science. Tu as toujours veillé à ce que je réussisse, j'espère qu'aujourd'hui je te fais honneur, après toutes ces années, et que tu es fière de moi.

Je voudrais remercier mes deux collègues, à commencer par Alejandra LOPEZ, chercheuse avec qui j'ai partagé ces années de thèse. Toutes les deux dans le même bateau, nous avons su nous soutenir mutuellement et affronter les tourments, mais toujours en gardant le sourire. Notre amitié n'en est ressortie que plus forte. Je remercie aussi Arnaud FONTBONNE pour son soutien et son aide durant mes premières années de thèse.

Je remercie chaleureusement les personnes qui m'ont quotidiennement facilité la vie au laboratoire : Gaëlle, pour sa bonne humeur et sa disponibilité ; Maria, pour sa joie de vivre et nos discussions interminables ; Bouchra, pour sa gentillesse et sa douceur ; Emmanuelle, pour son accueil chaleureux tous les matins et sa bienveillance ; Stéphane, avec qui j'ai partagé des heures et des heures en salle de culture, merci pour ton aide, tes conseils et ta gentillesse ; Delphine et Kévin, pour leur bonne humeur, leur gentillesse et leur disponibilité. Je voudrais aussi remercier Louise, Laura, Pauline, Jean-Michel et Laurie pour leur amitié, leur soutien et leur grande attention pour mes cellules.

J'exprime également ma profonde reconnaissance à tous les membres du laboratoire NICN et du laboratoire LNIA, que je n'ai pas pu citer, pour leur disponibilité, leurs encouragements, ainsi que leur coopération et leur sympathie tout au long de ma thèse, en particulier les docteurs **Arnaud NORENA** et **Christine ASSAIANTE** pour leur soutien, leur générosité ainsi que pour leurs conseils de méthodologie.

Je tiens également à remercier tous ceux en dehors du laboratoire : l'équipe du **Dr Patrick DELMAS** pour les tests d'électrophysiologie ; nos partenaires du projet européen avec lesquels j'ai eu le plaisir de travailler, en particulier nos collaborateurs américaines de l'équipe de Stephan HELLER, notamment Ealy MEGAN pour son aide avec les tests Fluidigm ; ainsi que nos collaborateurs anglais de l'équipe de Marcelo RIVOLTA, en particulier Sarah BODDY, pour ses conseils de culture et de différenciation des iPSC.

Gardant le meilleur pour la fin, que serais-je devenue sans mon cher époux, la personne qui a su guider mes pas égarés vers un horizon plus clair, plus joyeux, qui m'a apporté son soutien et son amour au moment où j'en avais le plus besoin ? Tu as su prendre soin de moi et être là dans les bons comme dans les mauvais moments. Tu as fait preuve d'une grande tolérance vis-à-vis du peu de temps que je t'ai accordé ces derniers mois. Cher mari, tu trouveras dans ce travail l'expression de mes sentiments d'amour et de reconnaissance les plus sincères.

Je tiens à remercier toute ma famille, en particulier mes chers cousins, ainsi que mes amis pour leur soutien, leur confiance : merci d'avoir cru en moi.

Enfin, je ne peux conclure ces remerciements sans une énorme pensée à ma mère, sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Un immense merci également à mes deux sœurs Amal et Wiam. On dit « loin des yeux loin du cœur », mais ce n'est pas vrai. Malgré la distance qui nous sépare, vous étiez toujours présentes aux moments difficiles, en particulier mon petit ange, mon adorable sœur Wiam, qui n'a pas cessé de m'envoyer des messages pour me détendre et m'encourager. Tu étais et tu resteras toujours ma source de joie et d'inspiration. Un jour, ce sera ton tour et je t'apporterai mon soutien, je ferai de mon mieux pour que tu réussisses. Je te vois grandir jour après jour, mais à mes yeux tu resteras toujours mon bébé d'amour.

Table des matières

AVANT PROPOS.....	1
INTRODUCTION.....	5
1. Anatomie et physiologie du système auditif.....	6
1.1. L'oreille externe.....	6
1.2. L'oreille moyenne.....	7
1.3. L'oreille interne.....	7
1.3.1. La cochlée.....	7
1.3.2. L'organe de Corti.....	8
1.4. Physiologie du système auditif.....	11
2. Développement de l'oreille interne.....	13
2.1. Origine de l'oreille interne.....	13
2.2. Voies de signalisation.....	15
2.2.1. La voie des FGF.....	15
2.2.2. La voie BMP.....	16
2.2.3. La voie WNT.....	17
2.2.4. La voie NOTCH.....	19
2.2.5. La voie SHH.....	22
2.3. Facteurs de transcription impliqués dans le développement de l'OI.....	23
3. Surdités neurosensorielles.....	26
3.1. Surdités de transmission et surdités neurosensorielles.....	26
3.2. Surdités syndromiques et isolées.....	27
4. Vers une médecine régénérative de l'oreille.....	28
4.1. Régénération des cellules ciliées chez les mammifères.....	28
4.2. Les cellules souches pour le traitement des surdités neurosensorielles.....	29

4.2.1.	Les cellules souches	30
4.2.1.1.	Les cellules souches totipotentes.....	31
4.2.1.2.	Les cellules souches pluripotentes.....	31
4.2.1.3.	Les cellules souches multipotentes.....	31
4.2.1.4.	Les cellules souches pluripotents induites (iPSC).....	32
4.2.2.	La thérapie cellulaire pour les surdités neurosensorielles	32
5.	Objectifs	35
	RESULTATS	38
1.	Rôle de la voie Notch dans la différenciation des hiPSC en cellules ciliées.....	39
1.1.	Objectifs de l'étude	39
1.2.	Article N°1: Modulation of Notch pathway enhances inner ear otic sensory cell differentiation from human induced pluripotent stem cells.....	40
2.	Mécanismes d'action de la voie Wnt dans la différenciation otique et la spécification des cellules ciliés	74
2.1.	Objectifs de l'étude	74
2.2.	Article N°2: Modulating FGF, TGF- β and WNT signaling pathways to differentiate human induced pluripotent stem cell into hair cell-like cells.....	75
	DISCUSSION GENERALE	110
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	120
	ANNEXE	126
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	130

Table de figures

Figure 1: Schéma illustrant l'anatomie de l'oreille humaine	6
Figure 2: Coupe transversale de la cochlée	8
Figure 3: Observation au microscope électronique à balayage de l'épithélium cochléaire d'un rat adulte	10
Figure 4: Schéma représentant l'organe de Corti en coupe transversale	10
Figure 5: Schéma de la propagation du son depuis l'oreille externe jusqu'au cerveau ...	12
Figure 6: Développement de l'oreille chez l'homme et la souris	14
Figure 7: Voie canonique Wnt/β-caténine	18
Figure 8: Voie de signalisation NOTCH	20
Figure 9: Schéma des différents types de signalisation de la voie Notch dans l'oreille montrant les conséquences phénotypiques	22
Figure 10: Induction de la placode otique et des cellules neurosensorielles	25
Figure 11 : Les différents types de cellules souches	30
Figure 12: Stratégie de différenciation des cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC) en cellules otiques	37
Figure 13: Caractérisation des cellules après 27 jours de différenciation	116
Figure 14: Enregistrement des courants voltage-dépendants à partir des hiPSC à J20 différenciées après inhibition de Notch	119
Figure 15: Caractérisation des cellules traitées avec Wnt puis Notch	123
Figure 16: Caractérisation du modèle d'ototoxicité chez le cobaye	127
Figure 17: Localisation des cellules 14 jours après la greffe	129

Liste des abréviations

aNotch : activated Notch

ASC : Cellules Souches Adultes

BMP/ Bone Morphogenetic Proteins

CA : Conduit Auditif

CC : cellules ciliées

CCE : Cellules Ciliées Externes

CCI : Cellules Ciliées Internes

CN : Crête Neurale,

CS : Cellules de Soutien

Dsh : protéine Disheveled

Ect : Ectoderme

ENN : Ectoderme non-neural

EPP : Ectoderme pré-placodal

ESC : Cellules Souches Embryonnaires

FGF : Fibroblast Growth Factor

GSI: Inhibiteur de la Gamma Secrétase

hESC : Cellules Souches Embryonnaires Humaines

hiPSC : Cellules Souches Pluripotentes Induites humaines

iPSC : Cellules Souches Pluripotentes Induites

MB : Membrane Basilaire

Meso : Mesoderme,

MT : Membrane tectoriale

NG : Neurones Ganglionnaires

NICD : Domain IntraCellulaire de Notch

Nt : Notochorde

OE : Oreille Externe

OI : Oreille Interne

OM : Oreille Moyenne

OMS : organisation mondiale de la santé

PKC: Protéine Kinase C

PN : Placode Neurale,

PO des placodes otiques

RPP : Région Pré-Placodale

Shh : Sonic hedgehog
SM : Scala Media
Smo : protéine Smoothened
ST : Scala Tympanic
SV : Scala Vasularis

TGF- β : Transforming Growth Factors

AVANT PROPOS



“When you lose your vision, you lose contact with things; when you lose your hearing, you lose contact with people.” **Helen Keller**, *conférencière et militante politique américaine, bien qu'elle soit aveugle et sourde depuis l'enfance, elle fut la première personne handicapée à obtenir un diplôme universitaire*

Alors que l'on trouve insupportable la perte de vision qui rend la lecture difficile, qu'en est-il de la perte de l'audition qui nous coupe du monde, qui nous prive de la conversation avec nos proches, du chant des oiseaux et de tant de sources d'émotion ou de plaisir, qu'il s'agisse de mots d'amour ou de magnifiques symphonies ? Contrairement aux autres sens, l'ouïe est un sens très privilégié, puisque c'est le premier sens qu'on développe avant même la naissance et une fois né, il constitue la base de nos interactions avec notre environnement. Un déséquilibre au niveau du système auditif affectera directement notre vie. Par exemple, certaines personnes peuvent avoir un odorat ou un toucher inexistant ou extrêmement diminué, et peuvent vivre en toute autonomie sans que cela soit un handicap important dans leur vie, certaines personnes ne s'en aperçoivent même pas (on parle alors d'anosognosie). Cependant, on ne peut perdre l'ouïe sans s'en apercevoir ou sans que son environnement s'en aperçoive. Un déséquilibre au niveau du système auditif affectera directement notre vie.

L'audition constitue une partie intégrante de notre vie et à tout instant on peut constater son utilité. Chez les animaux par exemples, l'audition est essentielle dans de nombreux comportements : défense, alimentation, sexualité. Chez certaines espèces, le sens de l'ouïe est très développé, comme chez la chouette, qui est particulièrement habile à localiser des sons très faible pour trouver sa proie pendant la nuit, ou chez la chauve-souris, qui possède un système auditif tout à fait original lui permettant de repérer sa proie par écholocalisation. De la même façon, chez l'homme, l'audition s'est développée au-delà des simples fonctions utilitaires de communications et de survie. Avec le développement du langage oral, l'audition est devenue un pilier de la communication entre les individus, des interactions sociales et joue également un rôle important dans la perception de l'espace.

Certains facteurs, d'origine génétique ou environnementale, peuvent diminuer cette aptitude et nuire au bon fonctionnement du système auditif. Ainsi, l'homme devient malentendant ou sourd dans les cas les plus extrêmes. Depuis de nombreuses années, la perte de l'audition a suscité un grand intérêt des chercheurs, pour comprendre les bases physiopathologiques responsables des différentes formes de surdité et leur trouver des remèdes. Grâce au progrès des techniques de biologie moléculaire, plusieurs travaux de séquençage du

génomique de familles malentendantes ont montré l'implication de la composante génétique dans la survenue de la surdité héréditaire des parents.

Sur le plan physiopathologique, dans la plupart des cas, la diminution de l'acuité auditive serait directement liée à l'intégrité des cellules ciliées (CC). Situées au niveau de la cochlée de l'oreille interne, dans les conditions normales, ces cellules sont responsables de la mécanotransduction des sons vers le cerveau. La gravité de la perte auditive dépend du nombre de CC endommagées, qui peuvent dégénérer partiellement ou totalement et donner lieu à une surdité neurosensorielle modérée ou profonde. Chez les mammifères, ce processus est malheureusement irréversible.

De nos jours, malgré les efforts investis dans l'étude des différentes formes de surdité, le nombre de personnes qui en souffrent ne cesse d'augmenter. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), aujourd'hui 360 millions de personnes dans le monde souffrent d'une perte auditive incapacitante. D'ici 2050, il prévoit que plus d'un milliard de personnes seront en situation de déficience auditive. Cela est principalement dû à l'absence d'un traitement curatif, permettant de remplacer les cellules perdues. A l'heure actuelle, les différents traitements prescrits sont basés sur l'utilisation d'appareils auditifs : des prothèses ayant un rôle dans l'amplification du son ou des implants cochléaires capables de transformer le son en signal électrique et de l'envoyer au nerf auditif. Ce type de traitement est utilisé en fonction de l'étiologie de la surdité et son retentissement. Il optimise la fonction auditive et améliore la qualité de vie des patients mais il ne restitue à aucun moment le parfait fonctionnement de l'oreille.

Toutes ces données font d'ores et déjà de la perte auditive un enjeu majeur de santé publique, qui a suscité la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques basées principalement sur la thérapie génique et la thérapie cellulaire. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés plus particulièrement au deuxième type de thérapie, la thérapie cellulaire.

Cette nouvelle approche consiste soit à remplacer les cellules mortes grâce à des cellules capables de se différencier en cellules appropriées, soit à favoriser la régénération du tissu en améliorant l'environnement des cellules épargnées. L'espoir suscité par la perspective d'utiliser les cellules souches pour traiter les surdités neurosensorielles a fait naître un domaine de recherche en perpétuelle évolution. Des recherches intensives à travers le monde cherchent à identifier l'approche et le candidat cellulaire idéal pour régénérer les CC. Ainsi, de nombreuses

études ont montré que des cellules souches, d'origine embryonnaire ou adultes, sont capables de se différencier en CC *in vitro*, et que leur greffe *in vivo* favorise la régénération des CC endommagées et une récupération partielle de la fonction auditive. **Mon travail de thèse s'inscrit dans le cadre de ces recherches et fait partie du projet européen OTOSTEM, qui vise à découvrir et à caractériser des types de cellules souches alternatifs adaptés à la thérapie cellulaire pour la surdité neurosensorielle.** Ma mission était d'étudier le potentiel de différenciation des cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC) en progéniteurs otiques. Le but de mon travail était de faire proliférer *in vitro* et se différencier des hiPSC en lignage otique, en agissant sur certaines voies de signalisation impliquées dans le développement de l'oreille interne *in vivo*. Ainsi, je devais développer un protocole fiable et efficace permettant de générer un nombre important de progéniteurs otiques à partir des hiPSC.

Le premier chapitre de cette thèse sera composé d'une introduction générale qui introduira les termes généraux et apportera de brèves synthèses sur les thématiques suivantes : **le système auditif, les voies de signalisations, les cellules souches, la régénération dans l'oreille.** Il développera ainsi le contexte dans lequel s'inscrit ce travail de recherche.

Le second chapitre sera consacré à mes résultats de recherche, présentés sous forme de deux articles scientifiques, précédés par une présentation de leurs objectifs :

- 1. Modulation of Notch pathway enhances inner ear otic sensory cell differentiation from human Induced Pluripotent Stem Cells*
- 2. Modulating FGF, TGF- β and WNT signaling pathways to differentiate human induced pluripotent stem cell into hair cell-like cells.*

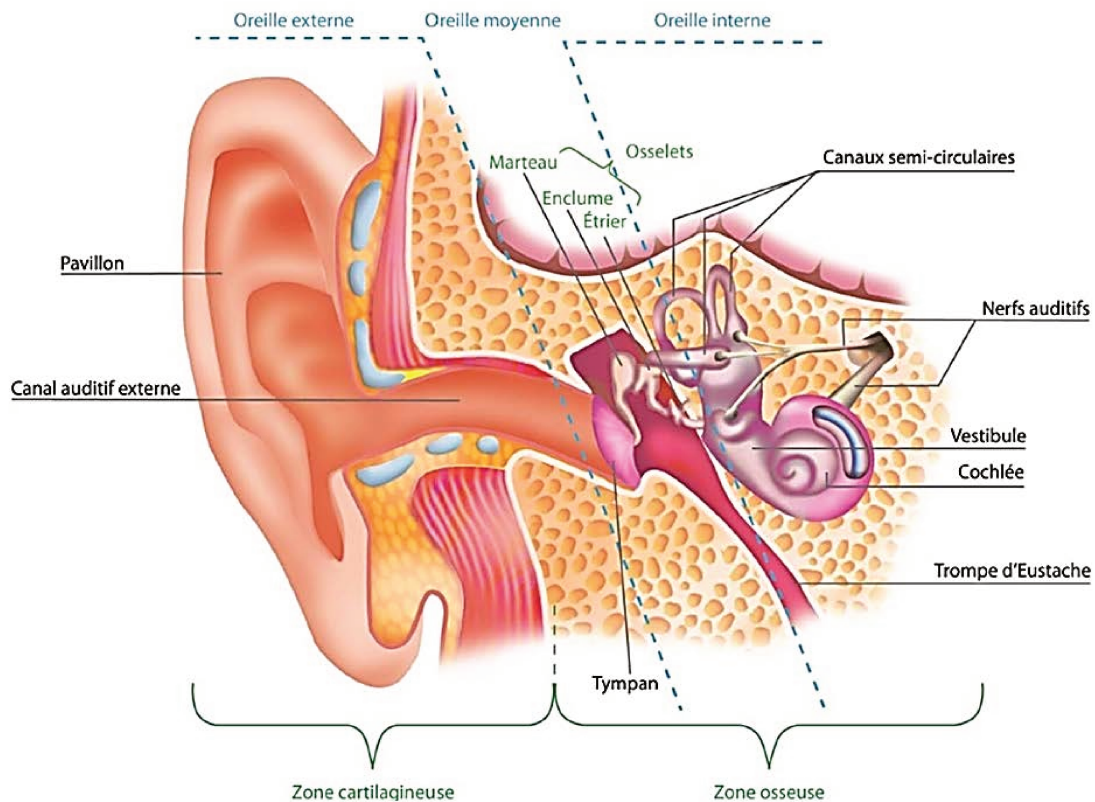
Le dernier chapitre me permettra de discuter les résultats obtenus en les mettant en perspective, les uns par rapport aux autres mais également en les confrontant aux données bibliographiques. Je discuterai ensuite des perspectives ouvertes par ce travail, en présentant des études complémentaires auxquelles j'ai participé.

INTRODUCTION

1. Anatomie et physiologie du système auditif

Le récepteur auditif, communément connu sous le nom d'oreille, est composé de plusieurs structures que l'on divise en 3 parties : l'oreille externe, l'oreille moyenne et l'oreille interne (**Figure 1**). Cette distinction se fait sur la base du mode de transmission et de cheminement des ondes sonores depuis l'oreille externe, jusqu'à perception au niveau du cerveau (Francis, 2013).

Figure 1: Schéma illustrant l'anatomie de l'oreille humaine



L'oreille se divise en trois parties. L'oreille externe comprend le pavillon, qui capte le son et l'envoie à l'oreille moyenne via le canal auditif externe. L'oreille moyenne, composée de la membrane tympanique et des osselets, assure la transmission mécanique des ondes sonores jusqu'à l'oreille interne. Celle-ci se compose principalement du vestibule, organe de l'équilibre, et de la cochlée, organe de l'audition. Photos tirée de <http://www.toutsureille.fr/tout-savoir-sur-oreille/lanatomie/>

1.1. L'oreille externe

Cette partie visible de l'oreille comprend deux parties : le pavillon et le conduit auditif externe. Le pavillon a une forme spécifique, qui ressemble à un entonnoir, permettant de capter et canaliser le son à l'intérieur de la tête via le conduit auditif. Le pavillon représente aussi une protection physique pour le reste de l'oreille. Chez l'homme, cette partie de l'OE est plus ou moins fixe, contrairement à certaines espèces animales, comme le chat et le cheval, qui ont la

capacité d'exercer un contrôle sur la position du pavillon et de pouvoir l'orienter vers la source du son.

1.2. L'oreille moyenne

L'oreille moyenne (OM) se compose principalement du tympan, petite cavité creusée dans l'os temporal. Cette cavité est recouverte d'une muqueuse formée de trois petits os : le marteau, l'enclume et l'étrier, les 3 plus petits os du corps, connus sous le nom de chaîne ossiculaire. La membrane du tympan sépare l'oreille moyenne du conduit auditif externe, elle joue le rôle d'intermédiaire dans le traitement de l'onde sonore. Le complexe tympano-ossiculaire est un véritable système d'amplification du son, elle est responsable de l'amplification de l'intensité des ondes sonores arrivant de l'oreille externe et de leur transformation en vibrations mécaniques qui seront envoyées à l'oreille interne (OI). L'OM communique avec l'OI via deux ouvertures : la fenêtre ronde et la fenêtre ovale. Elle communique également avec le pharynx par la trompe d'Eustache.

1.3. L'oreille interne

L'OI constitue le siège de la transduction des ondes sonores, elle est formée de deux parties structurelles : une partie osseuse dure de protection nommée « labyrinthe osseux » et une partie molle sensorielle appelée « labyrinthe membraneux ». Chaque labyrinthe comprend trois compartiments remplies de périlymphe et qui communiquent entre eux : le vestibule, les canaux semi-circulaires et la cochlée. Sur le plan fonctionnel, l'oreille interne est formée de deux organes : le vestibule, organe de l'équilibre, et la cochlée, organe de l'ouïe. Ces deux organes ont la même origine embryonnaire : la vésicule otique. Ainsi, ils partagent plusieurs propriétés morphologiques et physiologiques, comme le liquide endolymphatique présent dans le labyrinthe membraneux, et les cellules ciliées, qui assurent la mécanotransduction des sons. Dans ce rapport, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la cochlée, de sa physiologie à sa physiopathologie. Nous verrons dans ce chapitre comment un si petit organe assure, d'une façon fascinante, l'une des plus complexes fonctions, à savoir le sens de l'ouïe. Nous présenterons d'abord la cochlée, son anatomie ainsi que son origine, puis nous évoquerons les différents types de pathologies qui résultent en cas de dysfonctionnement (Coyne, 1876; Francis, 2013).

1.3.1. La cochlée

La cochlée appelée aussi « limaçon » correspond à la partie auditive de l'oreille interne ; c'est elle qui assure la transformation de l'information sonore mécanique en influx nerveux. Chez

l'homme, elle mesure environ 32 mm de long pour un diamètre de 2 mm. A la base de la cochlée se trouvent deux trous recouverts d'une membrane : la fenêtre ovale, située sous la partie plate de l'étrier, et la fenêtre ronde. Ces deux fenêtres assurent la communication entre l'OM et l'OI. Morphologiquement, la cochlée se présente sous forme de spirale, comme une coquille d'escargot, enroulée sur deux tours et demi autour d'une structure conique nommée le modiolum.

L'intérieur de la spire se divise en trois tubes : le canal cochléaire, qui contient l'organe de Corti, rempli d'endolymphe, la rampe vestibulaire au-dessus, et la rampe tympanique au-dessous, ces deux rampes contenant de la périlymphe (**Figure 2**). Le canal cochléaire est isolé de la rampe vestibulaire par la membrane de Reissner et séparé de la rampe tympanique par la membrane basilaire. L'organe de Corti repose sur cette membrane basilaire et ses cellules sont recouvertes par la membrane tectoriale (Larsen et al., 2017).

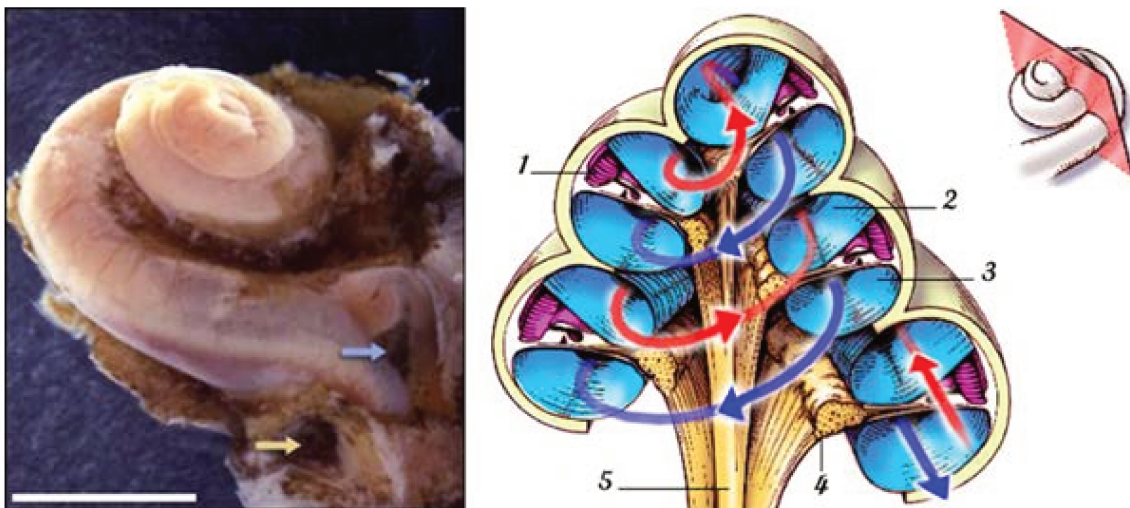


Figure 2: Coupe transversale de la cochlée.

(A gauche) Cochlée d'un fœtus humain de 5 mois, la capsule otique a été enlevée, découvrant les 2,5 tours de spire du labyrinthe. Les flèches indiquent la fenêtre ronde (flèche jaune) et ovale (flèche bleue), échelle = 0.5 mm. (A droite) Section schématisé de l'enroulement du canal cochléaire (1) contenant l'endolymphe, et celui des rampes vestibulaire (2) et tympanique (3) contenant la périlymphe. La flèche rouge vient de la fenêtre ovale et la bleue aboutit à la fenêtre ronde. Au centre (modiolum), le ganglion spiral (4) et les fibres du nerf cochléaire (5) apparaissent en jaune (<http://www.neuroreille.com>).

1.3.2. L'organe de Corti

Alfonso Giacomo Gaspare Corti, chirurgien et scientifique italien du XIX^{ème} siècle, fut l'un des premiers anatomistes à faire une description détaillée de cet organe qui porte désormais son nom. L'organe de Corti est composé principalement de cellules sensorielles appelées cellules ciliées (CC), des piliers de Corti, cellules rigides dressées de part et d'autre de l'organe de Corti,

et des cellules de soutien qui en forment la trame. L'observation en surface de l'épithélium cochléaire au microscope électronique à balayage indique la présence de deux types de CC bien organisées : les cellules ciliées internes (CCI), disposées en un seul rang, et les cellules ciliées externes (CCE) disposées en trois rangées ; à leur base, elles reposent fermement sur des cellules de soutien, ou cellules de Deiters, qui forment un siège sans les entourer. Les CC sont situées de part et d'autre du tunnel de Corti (**Figures 3 et 4**). Elles sont enserrées entre la membrane basilaire et une couche de tissu appelée lame réticulaire. A la surface des CC se dressent les stéréocils, chaque CC portant environ 100 stéréocils disposés de façon plus ou moins linéaire sur les CCI et sous forme de V sur les CCE. Les stéréocils constituent le siège de la mécanotransduction, c'est-à-dire de la transformation de la vibration sonore qui se propage en message nerveux interprétable par le cerveau.

Avant d'atteindre le système nerveux central, les ondes sonores se propagent le long de la membrane basilaire de la cochlée de la base vers l'apex, selon leur fréquence. Avec les hautes fréquences, la membrane basilaire étant plus rigide à la base, elle vibre considérablement en dépensant beaucoup d'énergie, et l'onde ne se propage pas très loin. En revanche, les ondes de basse fréquence se propagent jusqu'à l'apex de la membrane avant que toute l'énergie soit épuisée. La représentation topographique des fréquences sur la membrane basilaire, appelée tonotopie cochléaire, explique que la membrane basilaire présente un maximum de résonance, se déplaçant de la base vers l'apex de la cochlée au fur et à mesure que la fréquence du son diminue. Cela a été démontré grâce aux travaux du biophysicien américano-hongrois Goerg von Békésy (Prix Nobel de physiologie et de médecine en 1961), qui ont permis de mieux comprendre la sensibilité au son de la membrane basilaire (Von Békésy, 1960).

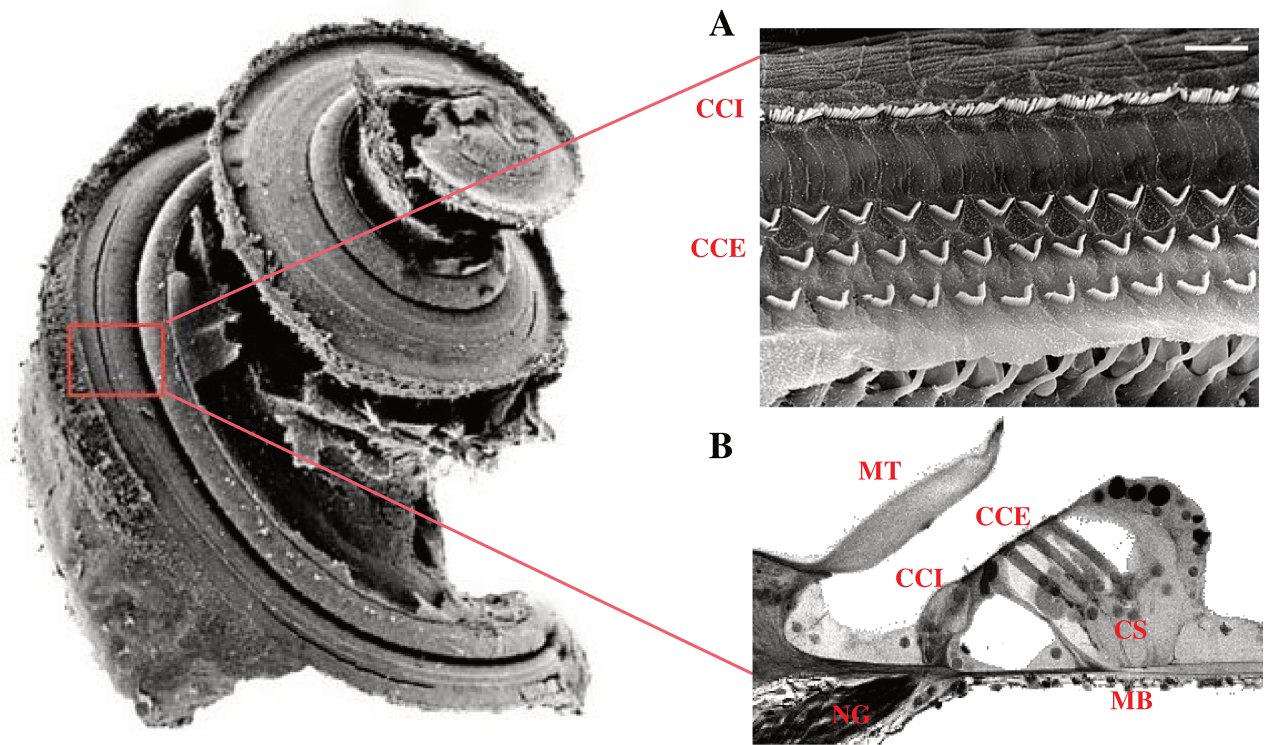


Figure 3: Observation au microscope électronique à balayage de l'épithélium cochléaire d'un rat adulte

(A) Vue de surface des cellules ciliées internes (rangée du haut) et des cellules ciliées externes (3 rangées du bas) séparées par les piliers. Échelle : 15 μ m. (B) Coupe transversale de l'organe de Corti : on peut distinguer les cellules ciliées internes (CCI) et externes (CCE) et les cellules de soutien ou de Deiters (CS). On peut également voir la membrane basilaire (MB), la membrane tectoriale (MT) et les neurones ganglionnaires (NG). (Lenoir et al., 1987)

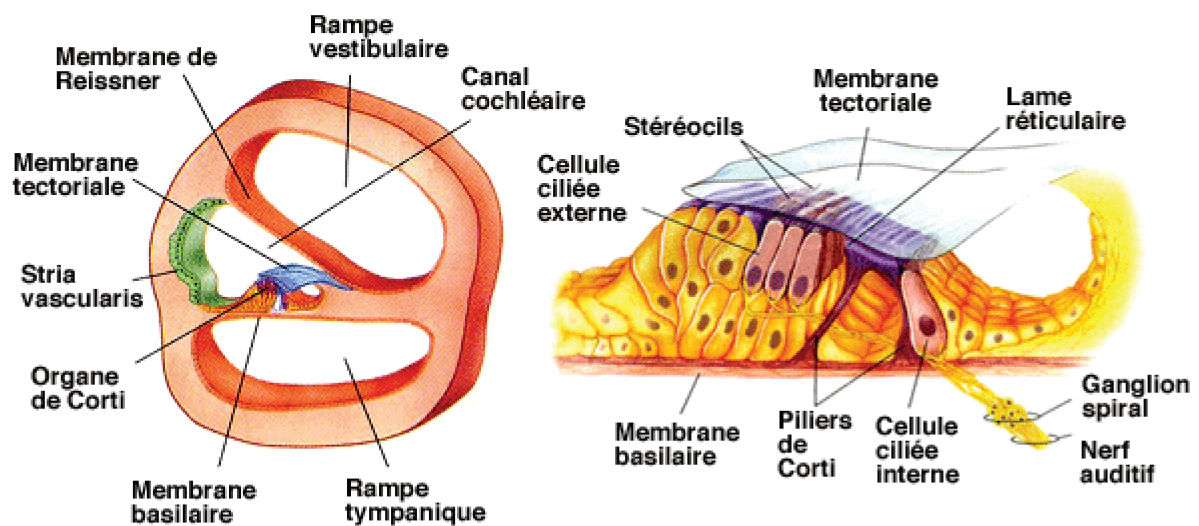


Figure 4: Schéma représentant l'organe de Corti en coupe transversale

La membrane basilaire est la base des tissus qui contient à la fois les cellules ciliées internes et les cellules ciliées externes ainsi que les piliers de Corti. La membrane tectoriale recouvre les stéréocils des CC.

1.4. Physiologie du système auditif

Les différentes structures du système auditif décrites précédemment communiquent entre elles d'une façon permanente afin d'assurer le bon fonctionnement du système auditif et par conséquent la perception des sons. Ce phénomène se déroule sur plusieurs étapes décrites dans cette partie (**Figure 5**). Le traitement des sons commence au niveau de l'OE. D'abord, le son produit par la variation perceptible de la pression de l'air est capté par le pavillon puis envoyé vers l'OM via le conduit auditif externe. Arrivé au niveau du tympan, le son se transforme en énergie mécanique qui fait vibrer la membrane tympanique puis les osselets. La vibration de ces derniers engendre à son tour des variations de pression dans les fluides remplissant la cochlée où siège l'organe de Corti. Ces mouvements liquidiens stimulent les CC, qui, elles, génèrent une impulsion électrique. Cette impulsion parcourt le nerf auditif, puis monte via les voies auditives pour atteindre le cortex auditif du cerveau. C'est à ce niveau que les vibrations sont finalement reconnues et perçues comme des sons. Ce processus se produit des milliers de fois tous les jours en une fraction de seconde.

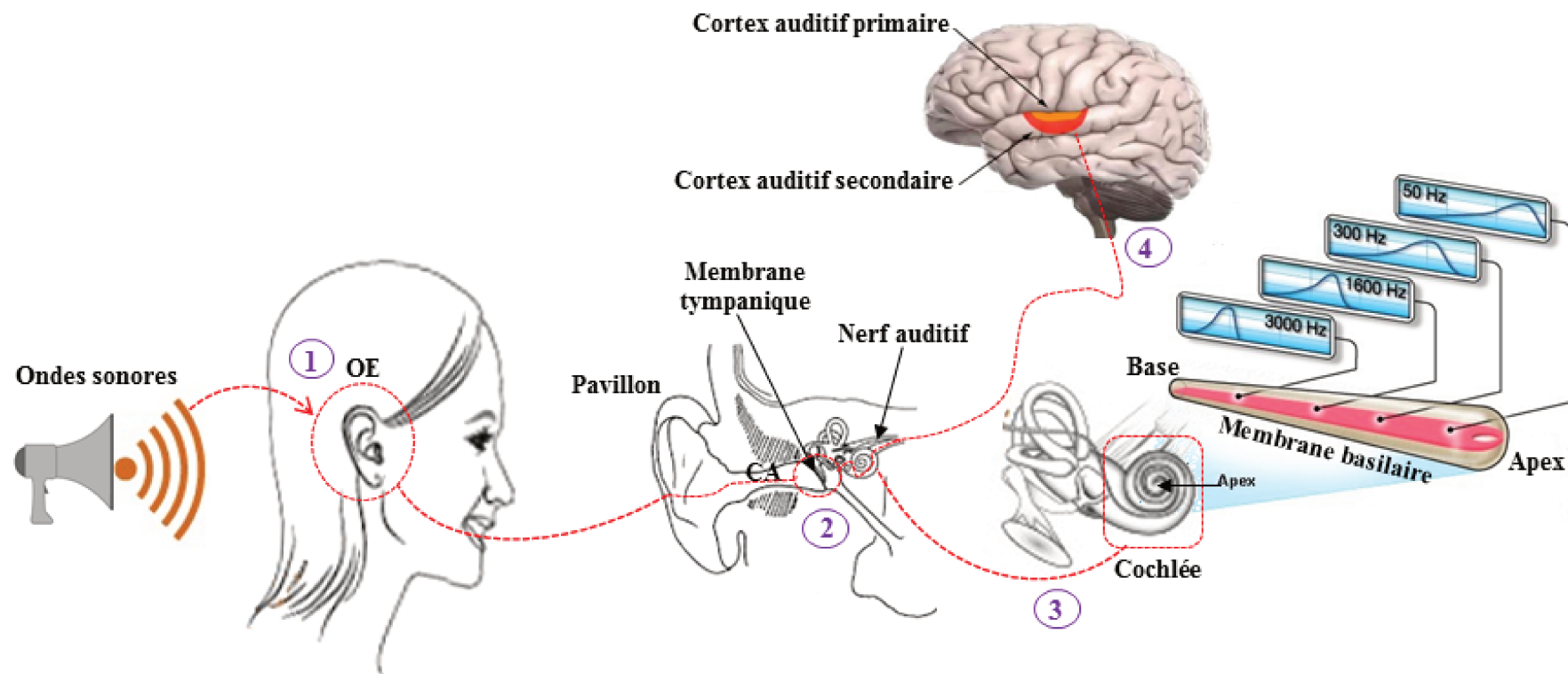


Figure 5: Schéma de la propagation du son depuis l'oreille externe jusqu'au cerveau

Stimulus externe, les ondes sonores sont captées par le pavillon (1) puis transmises à l'OM (2) via le conduit auditif (CA). Arrivées au niveau de la membrane tympanique, les ondes font vibrer les osselets et les fluides de la cochlée puis activent les cellules ciliées. Ces dernières sont responsables de la mécanotransduction des sons et assurent leur propagation sur la membrane basilaire de la base vers l'apex selon leur fréquence (3). Cette information électrique est ensuite acheminée par les fibres et envoyée via le nerf auditif au cerveau, qui l'interprète (4).

2. Développement de l'oreille interne

L'oreille interne existe chez tous les crâniates ; son histoire remonte aux gnathostomes, il y a plus de 444 millions d'années et sa fonction initiale était surtout liée à la perception des mouvements de l'animal. Différentes études de phylogenèse montrent qu'au fil de l'évolution, l'OI s'est profondément développée : elle est passée d'un simple organe stato-acoustique chez les vertébrés inférieurs à un organe complexe très sophistiqué chez les mammifères (Clack, 1993; Gayon and Ricqlès (de), 2015; Popper and Fay, 2012). Nous verrons dans cette partie le développement embryonnaire de l'OI ainsi que les mécanismes moléculaires et génétiques impliqués dans sa formation.

2.1. Origine de l'oreille interne

L'OI prend son origine dans l'ectoderme. Chez l'homme, le premier signe morphologique du développement de l'OI est observé vers la 3^{ème} semaine de gestation comme un épaississement de l'ectoderme non-neural (ENN), la surface de l'ectoderme. L'ENN est précurseur à la fois de l'épiderme et de l'ectoderme pré-placodal (EPP). Cette dernière région serait à l'origine des placodes crânielles sensorielles dénommées les placodes adéno-hypophysaires, olfactives, optiques, trigéminales, otiques et épibranchiales (Graham and Shimeld, 2013; Park and Saint-Jeannet, 2010). Les différentes placodes sont initialement formées à partir du même territoire, mais il se subdivise par la suite grâce à des signaux additionnels qui assurent de la spécification des placodes pour donner naissance aux différents organes sensoriels (Schlosser, 2006). La formation de l'OI nécessite des voies de signalisation particulières, que nous décrirons par la suite. L'action combinée de ces voies de signalisation induit la formation des placodes otiques (PO) à partir l'EPP. Les deux PO apparaissent sur l'ectoderme superficiel à la fin de la 3^{ème} semaine de gestation humaine (19^{ème} jour). Au cours de la 4^{ème} semaine, les PO s'invaginent progressivement pour former la capsule otique, puis donnent naissance aux vésicules otiques (25^{ème} jour), qu'on appelle aussi otocystes. Ces vésicules se détachent rapidement de l'ectoderme et constituent une sphère creuse vers le 28^{ème} jour. De la 5^{ème} à la 7^{ème} semaine du développement embryonnaire, chacune des vésicules se développe et se déforme pour constituer les labyrinthes de l'OI. Le développement de l'oreille s'achève vers la 8^{ème} semaine ; cependant, elle ne devient partiellement fonctionnelle qu'à partir du 7^{ème} mois, quand le fœtus commence à entendre les sons d'une intensité de 20 à 30 décibels, équivalente au son des chuchotements (Larsen et al., 2017; Lim and Brichta, 2016; Romand and Varela-Nieto, 2014).

Homme	Description	Souris
19ème jour	1. Ectoderm non-neural	E7.5
21ème jour	2. Placode otique	E8
26ème jour	3. Invagination de la placode otique	E8.5
28ème jour	4. Vésicule otique (otocyste)	E9.5
56ème jour	5. Maturation	E17.5

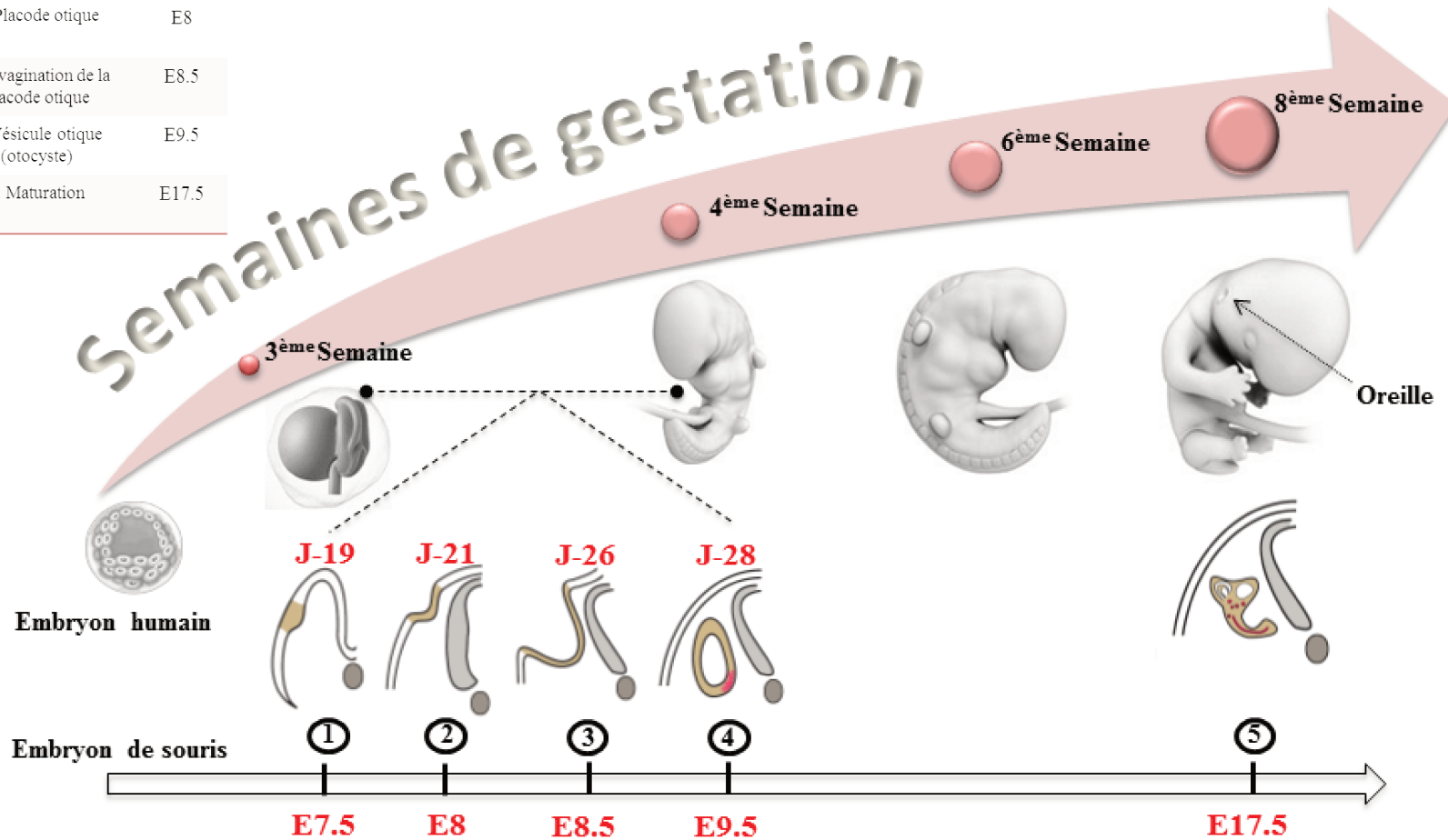


Figure 6: Développement de l'oreille chez l'homme et la souris.

Le développement de l'OI chez la souris (flèche du bas) est comparable à celui chez l'homme (en haut). La formation de l'OI est initiée dès le jour embryonnaire 6.5 (19^{ème} jour chez l'homme). La spécification de la région pré-placodale commence par un épaissement de l'ectoderme, à l'origine de la placode otique. Cette dernière s'invagine progressivement et se transforme en vésicule otique, ou otocyste, qui donne naissance à l'OI. La partie ventrale de la vésicule forme l'organe de de l'audition, la cochlée, tandis que la partie dorsale est à l'origine des structures vestibulaires.

Durant l'embryogenèse, le développement de l'OI se déroule selon des étapes progressives régulées par différents gènes et voies de signalisation orchestrées dans l'espace et dans le temps. Pour comprendre ces mécanismes, des études se sont intéressées au développement de l'OI chez des animaux sains ou mutés, notamment chez la souris, dont la morphogenèse de l'OI ressemble étroitement à celle de l'homme (**Figure 6**). Ces travaux ont montré que la spécification de l'OI et la formation des CC impliquent une série d'activation/inhibition de plusieurs voies de signalisation comme les voies WNT, BMP, FGF, SHH et NOTCH. Nous verrons dans la section suivante comment ces signalisations sont coordonnées et assurent le développement de l'oreille interne et la formation des cellules sensorielles.

2.2. Voies de signalisation

2.2.1. La voie des FGF

Les membres de la famille des FGF (Fibroblast Growth Factors) sont des protéines diffusibles. Leur signalisation requiert la participation de trois familles de protéines transmembranaires : des récepteurs de forte affinité à activité tyrosine kinase (FGFR), des récepteurs de forte affinité sans activité tyrosine kinase, riches en cystéines (CFR : chicken cystein rich fibroblast growth factor receptor), et des protéoglycanes à sulfate d'héparane (HSPG, récepteurs de basse affinité) (Fernig and Gallagher, 1994). Les FGF sont capables de déclencher deux processus de signalisation : l'activation par l'intermédiaire de leurs récepteurs d'une cascade de protéines transductionnelles et de seconds messagers conduisant à l'activation de gènes, et l'activation directe de plusieurs cibles nucléaires par transfert des FGF dans le noyau.

Les FGF sont fortement exprimés par le mésoderme et la plaque neurale. Plusieurs études ont montré l'implication de cette famille de facteurs de croissance dans la formation de l'OI (Adamska et al., 2001; Schimmang, 2007; Wright et al., 2003). Chez la souris, FGF3 et FGF10 semblent être importants durant les premiers stade du développement de l'OI, où ils jouent un rôle primordial dans l'induction et la formation de la placode otique (Wright, 2003). L'inactivation concomitante du FGF3 et du FGF10 fait diminuer l'expression des marqueurs précoces de la placode otique tels que PAX2 et DLX5. Ces souris mutées *fgf3*^{-/-}; *fgf10*^{-/-} présentent une vésicule otique de taille réduite et une absence de ganglion cochléo-vestibulaire (Alvarez et al., 2003; Zelarayan et al., 2007). Par ailleurs, la surexpression de FGF10 est suffisante pour induire la formation de vésicules otiques ectopiques exprimant des marqueurs

otiques (Alvarez et al., 2003). En outre, FGF8 est également nécessaire pour l'induction otique. Sa mutation ne modifie pas la formation de la vésicule otique ; cependant, l'analyse de souris doublement déficientes pour les FGF3 et FGF8 montre que celles-ci présentent un phénotype similaire aux doubles mutants *fgf3*^{-/-};*fgf10*^{-/-} avec une diminution de la taille de la vésicule otique, voire parfois même l'absence complète d'otocyste (Ladher et al., 2005; Zelarayan et al., 2007). Ainsi, il existe un rôle redondant des FGF3, 8 et 10 dans l'induction de la placode otique chez les mammifères. D'autres études montrent que FGF2 (ou bFGF) est exprimé chez la souris au niveau de la placode et la vésicule otique (Vendrell et al., 2000) et favorise la prolifération et la différenciation des CC (Low et al., 1996) . Néanmoins, les souris dépourvues de FGF2 ne présentent aucune anomalie de l'oreille interne (Carnicero et al., 2004). En plus de ces FGF, le FGF20 est aussi nécessaire pour la spécification des cellules sensorielles, la culture d'explants cochléaires de souris en présence d'un inhibiteur du récepteur FGF20 bloque la formation de l'épithélium sensoriel et inhibe la formation des cellules ciliées et des cellules de soutien (Hayashi et al., 2008).

Pour résumer, toutes ces études confirment l'implication de la signalisation FGF dans le développement de l'OI, notamment dans l'induction de la placode otique, la spécification du domaine prosensoriel ainsi que la différenciation des cellules ciliées et des cellules de soutien.

2.2.2. La voie BMP

Les membres de la famille des BMP (*Bone Morphogenetic Proteins*) font partie de la grande famille des *Transforming Growth Factors*, qui comprend également le TGF- β et les activines. La transduction du signal est déclenchée par la fixation de l'homodimère de BMP sur son récepteur de type II, ce dernier recrutant ensuite un récepteur de type I. Ces récepteurs sont des récepteurs transmembranaires sérine/tyrosine kinase qui activent soit la voie canonique médiée par les SMAD, soit la voie des MAP Kinases, ces deux voies conduisant à la régulation de gènes cibles.

Tout comme la voie de signalisation FGF, la signalisation BMP est impliquée dans les différents processus de développement de l'OI. Cette voie de signalisation aurait un rôle crucial dans la spécification de la région EPP via l'activation de facteurs de transcription (Watanabe et al., 2015). Chez le poisson-zèbre, une activation de la voie BMP avant la gastrulation favorise l'expression de facteurs de transcription, notamment *Tfap2a*, *Tfap2c*, *Foxi1* et *Gata3*, et induit la différenciation de l'ENN. Cependant, la spécification de l'identité pré-placodique durant la gastrulation, nécessite une inhibition complète des BMP. Dans la différenciation de l'OI, l'effet

de la signalisation dépend donc du contexte (Kwon et al., 2010). Cela a été confirmé *in vitro* : la modulation de la voie BMP induit la différenciation des cellules souches embryonnaires humaines en cellules de l'EPP (Leung et al., 2013). De plus, chez le poulet, parmi les nombreux membres de la famille BMP, le BMP-7 est impliqué dans la spécification des CC et semble avoir un rôle dans l'organisation tonotopique de la cochlée (Mann et al., 2014). De la même façon, le BMP-4 a un rôle dans la génération de l'épithélium sensoriel dans l'OI. Son activation entraîne une augmentation du nombre de CC, alors que son inhibition bloque leur différenciation (Fantetti and Fekete, 2012; Li et al., 2005).

2.2.3. La voie WNT

Les molécules de la famille WNT sont des glycoprotéines transmembranaires sécrétées qui se fixent sur leurs récepteurs Frizzled (Fz). Il en résulte deux types de signalisation : la voie canonique et la voie non canonique. La voie canonique est médiée par la β -caténine, molécule à double rôle : contrôle l'adhérence cellulaire et participe à la transmission du signal relayé par les facteurs de la famille Wnt (Cadigan and Nusse, 1997). Comme présenté dans la **figure 7**, en absence des protéines Wnt, la β -caténine est phosphorylée puis dégradée à cause de la destruction du complexe auquel elle est liée. En revanche, la liaison des Wnt à leur récepteur membranaire Fz inhibe la dégradation de la β -caténine, car Disheveled (Dsh), l'effecteur de la voie Wnt canonique, inhibe la GSK-3, responsable de la phosphorylation et donc de la dégradation de la β -caténine. Par conséquent, la β -caténine s'accumule dans le cytoplasme puis elle est transloquée dans le noyau, où elle forme des complexes transcriptionnels actifs avec LEF/TCF pour activer la transcription des gènes cibles de la voie Wnt (van Amerongen and Nusse, 2009; Cadigan and Nusse, 1997; Jansson et al., 2015). Dans le deuxième type de signalisation WNT, la voie non canonique, l'activation des Wnt résulte aussi de leur liaison aux récepteurs Fz, et Dsl est également activé, mais au lieu d'entraîner une stabilisation de la β -caténine, cette voie non canonique active la voie Calcium/PKC, qui augmente le taux de calcium intracellulaire et active la protéine kinase C (PKC). Cette voie a un rôle dans la polarisation et la réorganisation du cytosquelette, comme c'est le cas dans les stéréocils (De, 2011; Jansson et al., 2015).

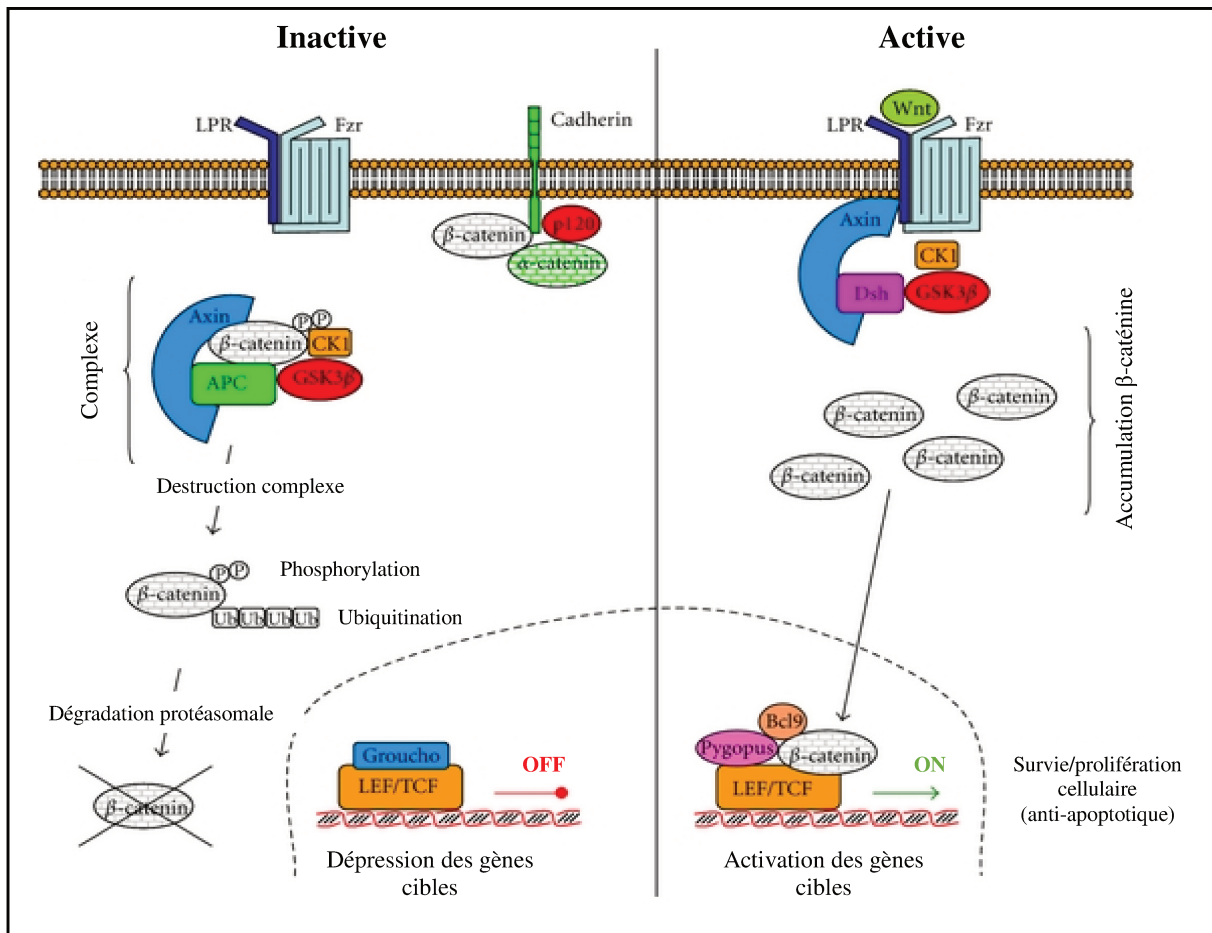


Figure 7: Voie canonique Wnt/β-caténine

Sans activation du récepteur Frizzled (Fz) (à gauche), la Glycogène Synthase Kinase-3 (GSK-3) phosphoryle la β-caténine et un complexe β-caténine phosphorylée/GSK-3/APC/Axin se forme puis est dégradé par voie protéosomale. La fixation d'une protéine Wnt au récepteur Fz, sur le Cystein-Rich Domain (CRD) et au corécepteur LRP, active la protéine Dishevelled (Dsh), qui inhibe la GSK-3. La β-caténine s'accumule dans le cytoplasme et peut être transloquée vers le noyau, où elle s'associe au complexe T-Cell Factor (TCF), qui agit sur la transcription (d'après Centelles, 2012).

La voie de signalisation WNT est largement décrite dans la littérature pour ses multiples rôles dans le développement de l'OI (revu dans (Munnamalai and Fekete, 2013)). Chez la souris, les facteurs Wnt en provenance du rhombencéphale sont nécessaires pour limiter la région ectodermique destinée à former la placode otique (Ohyama et al., 2006, 2007). En effet, la voie Wnt contrôlerait, par l'intermédiaire de la voie canonique, le destin de la région ectodermique en agissant sur les précurseurs Pax2-positifs pour leur attribuer un destin placodal plutôt qu'ectodermique (Ohyama et al., 2006). A l'heure actuelle, on ne sait exactement pas lequel des facteurs Wnt joue un rôle dans l'induction de la placode otique chez les mammifères. Chez la souris, Wnt8 est exprimé dans le rhombomère 4 (Bouillet et al., 1996; Hume and Dodd, 1993) et Wnt1 et 3a sont présents dans la partie dorsale du rhombencéphale (Parr et al., 1993;

(Riccomagno et al., 2005). Ils constitueraient ainsi de bons candidats en tant qu'inducteurs de la placode otique. Par ailleurs, les Wnt jouent également un rôle dans la détermination du destin vestibulaire. Chez les souris *wnt1*^{-/-} ; *wnt3a*^{-/-}, l'absence d'expression de Dlx5 et 6 est observée dans la portion dorsale de l'otocyste. Ultérieurement lors du développement, ces souris seront dépourvues de structures vestibulaires (Riccomagno et al., 2005). Les rôles précis de chacune des protéines WNT est encore mal connu, mais d'une façon globale, la voie WNT est impliquée dans plusieurs processus durant le développement de l'OI : dans la détermination de la taille des placodes otiques (DeJonge et al., 2016; Head et al., 2013; Jayasena et al., 2008), le développement des cellules neurosensorielles (Matsuoka et al., 2017), la régulation de la prolifération et de la différenciation des CC (Jacques et al., 2013, 2014), ainsi que la dédifférenciation des cellules de soutien en CC (Shi et al., 2012, 2013).

2.2.4. La voie NOTCH

Notch est un récepteur transmembranaire qui peut se lier à travers son domaine extracellulaire aux ligands Jagged ou Delta exprimés dans les cellules voisines (**Figure 8**). Le clivage du récepteur Notch par la gamma-sécrétase libère le domaine intracellulaire Notch (NICD) de la membrane cellulaire. Lorsqu'il est transloqué dans le noyau, il forme un complexe avec d'autres protéines, conduisant à l'activation transcriptionnelle des gènes cibles de la voie Notch, comme les facteurs de transcription de la famille bHLH. La fonction de la voie Notch est donc assurée par des récepteurs (Notch1-4), des ligands (Delta1 et 2, Jagged1 et 2) et des modulateurs (Lnfg, Hes1, Hes5, par exemple).

La voie Notch régule de nombreux processus biologiques, tels que la détermination du destin cellulaire, la prolifération, l'apoptose, la différenciation cellulaire ou encore la division cellulaire asymétrique (revus dans Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Hori et al., 2013). La signalisation Notch est largement impliquée dans le développement de l'OI (revu dans Murata et al., 2012), : c'est le principal régulateur de la formation de la placode otique et de la spécification des CC. Par exemple, le travail de Savoy-Burke *et al.* a montré que l'activation de Notch chez la souris inhibait la différenciation des CC et entraînait une surdité profonde (Savoy-Burke et al., 2014). Une surexpression du NICD réduit aussi la taille de l'épithélium cochléaire ainsi que le nombre de CC et de cellules de soutien (Tateya et al., 2015).

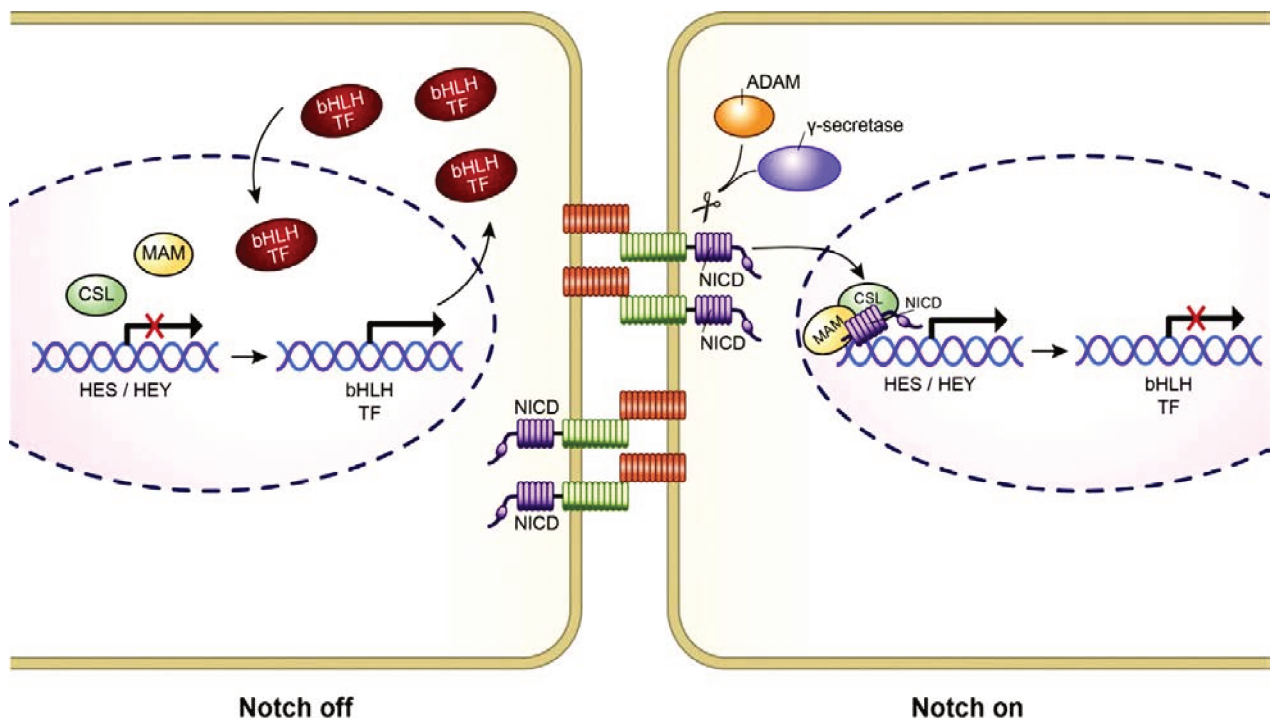


Figure 8: Voie de signalisation NOTCH

Les ligands et les récepteurs Notch sont localisés aux membranes cellulaires de deux cellules adjacentes. Le récepteur Notch traverse la membrane cellulaire et dépasse de chaque côté. La partie du récepteur Notch qui se trouve à l'intérieur de la cellule (en mauve) est appelée domaine intracellulaire Notch (NICD). La partie du récepteur Notch se trouvant à l'extérieur de la cellule (en vert) se lie aux ligands Notch, et il en résulte deux clivages protéolytiques : l'un catalysé par les métalloprotéases de la famille ADAM, l'autre par la gamma-sécrétase. Le clivage de la partie transmembranaire par la gamma-sécrétase libère le NICD, qui est transloqué dans le noyau, où elle forme un complexe avec la protéine CSL (protéine de liaison à l'ADN, et le co-activateur transcriptionnel MAM). Le complexe transcriptionnel NICD-CSL-MAM active l'expression des gènes cibles de Notch de la famille HES/HEY et des facteurs de transcription (Notch ON). Ensuite, les facteurs de transcription HES / HEY fonctionnent comme des répresseurs transcriptionnels et bloquent l'expression de facteurs de transcription de la famille bHLH, par exemple Atoh1. Lorsque la signalisation Notch est désactivée (Notch Off), le complexe NICD-CSL-MAM ne se forme pas et les facteurs de transcription HES / HEY ne répriment pas l'expression des facteurs de transcription bHLH (Žak et al., 2015).

Bien que l'activation de Notch ne montre pas une activation de l'expression des marqueurs des cellules sensorielles, son inhibition favorise le phénotype otique et la différenciation des CC via plusieurs mécanismes. Comme expliqué précédemment, la voie Notch résulte d'une interaction entre deux cellules, l'une exprimant le ligand (celle qui envoie le signal) et l'autre exprimant le récepteur (cellule réceptrice du signal). De cet fait, l'importance de la voie Notch réside dans sa capacité d'influencer le devenir des cellules voisines, en promouvant un état cellulaire dans une cellule donnée et en favorisant l'adoption d'un état cellulaire opposé dans la cellule adjacente. Ce mécanisme développemental porte le nom d'inhibition latérale et permet l'émergence de deux types cellulaires distincts au sein d'un groupe de cellules homogènes. Dans l'OI, ce mécanisme est largement décrit : comme les CC sont entourées de cellules de soutien, Notch serait impliqué non seulement dans la différenciation des CC mais aussi dans celle des cellules de soutien (Kiernan, 2013). Dans le développement de l'OI, l'activation de la voie Notch génère une boucle de rétrocontrôle négatif qui lui permet de réprimer son ligand. D'une façon générale, les précurseurs sensoriels qui expriment davantage les ligands Delta et Jagged se différencieront en cellules sensorielles ciliées, tout en inhibant cette différenciation dans les cellules voisines (où Notch est activé), qui deviendront des cellules de soutien (Daudet, 2005; Daudet et al., 2007; Zine, 2003; Zine et al., 2000, 2001).

Néanmoins, la signalisation Notch est plus complexe et peut agir via un autre mécanisme de signalisation connu sous le nom de « induction latérale » : ce deuxième type de communication intercellulaire met en jeu deux types cellulaires distincts exprimant des répertoires de ligands et de récepteurs différents. Dans ce cas, la signalisation Notch induira la différenciation vers un type de cellules donné (Hartman et al., 2010; Petrovic et al., 2014). Chez les souris Slalom (Tsai et al., 2001) et Headturner (Kiernan et al., 2001) chez lesquelles on a invalidé le gène Jagged 1, du ligand du récepteur Notch, on observe une réduction du nombre de cellules ciliées et non pas un accroissement. C'est donc une induction latérale qui expliquerait le rôle de Jagged1 (Kiernan et al., 2006). Via les différents mécanismes qu'on vient de décrire (**Figure 9**), la voie Notch semble avoir un rôle crucial dans le développement de l'OI (Slowik and Bermingham-McDonogh, 2013). Elle est impliquée dans l'induction de la placode otique et la détermination de sa taille (Jayasena et al., 2008), la spécification du domaine pro-sensoriel (Daudet, 2005; Daudet et al., 2007; Jeon et al., 2011) et le contrôle de la différenciation des CC et des cellules de soutien (Pan et al., 2010).

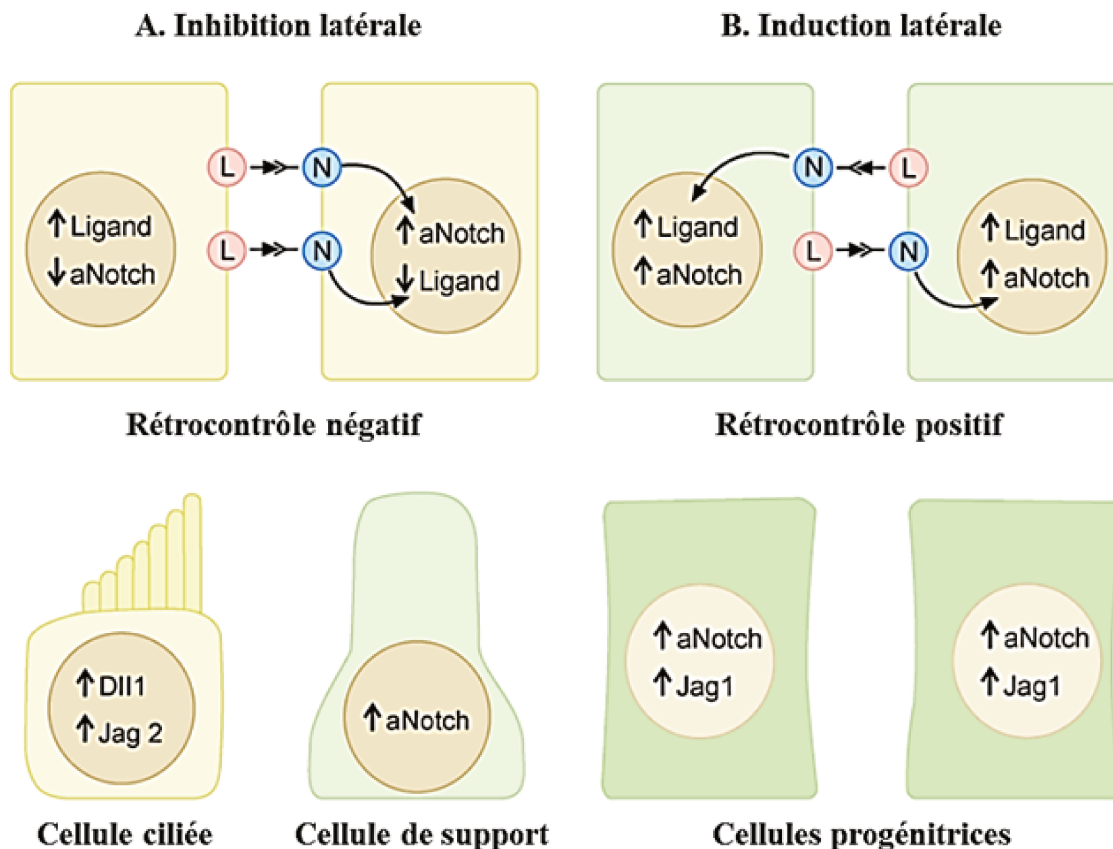


Figure 9: Schéma des différents types de signalisation de la voie Notch dans l'oreille montrant les conséquences phénotypiques.

(A) Lors de l'**inhibition latérale** : La cellule émettrice de signal a plus de ligand Notch (rose) et la cellule réceptrice, plus de Notch actif (aNotch). aNotch inhibe l'expression de gène proneuraux (ex. : Atoh1) et entraîne une régulation négative du ligand Notch, diminuant ainsi l'efficacité de la réponse de la cellule voisine (rétrocontrôle négatif). Cette signalisation se poursuit jusqu'à ce qu'une cellule (la cellule d'émission de signal) ait des quantités élevées de ligand de Notch et de très bas niveaux de aNotch. À l'inverse, la cellule réceptrice de signal aurait de faibles quantités de ligand Notch et aNotch très élevé, ce qui induira la différenciation de la cellule émettrice en cellules ciliées, et la cellule réceptrice en cellule de soutien. Par conséquent, le phénotype « cellule ciliée » sera dominant par rapport aux cellules de support (ou cellules de soutien). (B). **Induction latérale** : dans ce type de signalisation, la transactivation du ligand engendre une uprégulation du ligand, ce qui entraîne une signalisation égale entre les cellules, les deux exprimant finalement des quantités élevées de ligand et d'aNotch. Ce type de signalisation conduit à la spécification des cellules progénitrices sensorielles (par des mécanismes qui restent entre mal connus) et à la diminution des CC et des cellules de soutien (Kiernan, 2013).

2.2.5. La voie SHH

Sonic Hedgehog fait partie de la famille des protéines sécrétées Hedgehog, qui comprend un seul membre chez la drosophile (Hh) et trois chez les mammifères et les oiseaux (Sonic, Indian et Desert hedgehog). Dans un modèle simplifié, le ligand sécrété Shh se lie à son

récepteur Patched, entraînant la downrégulation d'une protéine transmembranaire Smoothed (Smo) dans les cellules cibles. Cela active les facteurs de transcription Gli, effecteurs de la signalisation Shh. La voie de signalisation de Shh est essentielle pour divers aspects de l'organogenèse, y compris la croissance et la spécification cellulaire (Varjosalo and Taipale, 2008). Dans le développement de l'OI, Shh est un des premiers régulateurs de l'orientation du destin de l'otocyste vers un phénotype cochléaire et de la spécification des CC (Atkinson et al., 2015; Liu et al., 2002). Chez les souris *shh*^{-/-}, knockout pour le gène *shh*, l'induction de la placode otique se fait normalement. Cependant, les dérivés de la portion ventrale de la vésicule otique ne croissent pas, c'est-à-dire le canal cochléaire, le saccule et le ganglion cochléo-vestibulaire (Riccomagno et al., 2002). Une étude plus récente montre que l'ablation conditionnelle de Smo dans l'épithélium cochléaire en développement entraîne une différenciation accélérée des CC dans la région apicale. À l'inverse, l'expression d'un Smo constitutivement actif dans l'épithélium cochléaire empêche la différenciation des cellules ciliées externes (Atkinson et al., 2015; Tateya et al., 2013).

2.3. Facteurs de transcription impliqués dans le développement de l'OI

Le développement de l'OI fait intervenir des messages intra- et inter-tissulaires avec un jeu d'équilibre entre des activateurs et des régulateurs. Dans la section précédente, nous avons décrit certaines voies de signalisation (résumées dans la **figure 10**) impliquées dans la formation de la placode otique et la spécification des CC. Ces voies communiquent entre elles d'une façon permanente et agissent séquentiellement et/ou en parallèle pour activer l'expression des facteurs de transcription du lignage otique. La formation des placodes otiques est l'une des étapes clés du développement de l'OI, ce processus est initié au cours de la neurulation et débute avec un épaissement de l'ectoderme. Des signaux BMP et FGF, émanant du mésoderme, induisent la formation de la région pré-placodale (RPP) à partir du NNE. Cette ségrégation progressive du devenir cellulaire des cellules ectodermiques est illustrée par le changement au cours du temps du profil d'expression d'un certain nombre de gènes. Des études du profil d'expression génique au cours du développement de l'OI montrent que le RPP est caractérisé par l'expression des gènes appartenant à la famille des *gata*, *dlx*, *six*, *eya*, *tfap*, *dach* et *foxi* (Chen and Streit, 2013; Ohyama et al., 2007). La signalisation FGF semble avoir un rôle non seulement dans la régionalisation du domaine pré-placodal, mais aussi dans la spécification du phénotype otique déterminée par la durée et le niveau d'exposition. Les signaux FGF associés à la signalisation Wnt, provenant de la crête neurale, induisent la formation de la placode otique (Mendonsa and Riley, 1999; Noramly and Grainger, 2002). Cette ségrégation s'opère par l'activation de

plusieurs facteurs de transcription, notamment ceux de la famille PAX, parmi lesquels on retrouve le PAX2 et le PAX8, fortement exprimés au niveau de la placode otique (Bouchard et al., 2010; Burton et al., 2004). Une fois la placode otique formée, elle s'invagine et se transforme en vésicule otique, dont les différentes régions de l'OI doivent être spécifiées, notamment les structures vestibulaires et cochléaires. Cette détermination s'effectue grâce à des signaux émanant de la notochorde et du rhombencéphale (Wnt, Notch, BMP, Shh...) et décrits précédemment (Chen et al., 2017; Driver and Kelley, 2009; Nakajima, 2015; Whitfield, 2015; Wu and Kelley, 2012).

Pour résumer, toutes les voies de signalisation qu'on vient de décrire communiquent entre elles d'une façon permanente. *in vivo*, leur action coordonnée régule l'expression des gènes nécessaire pour la formation de la placode otique ainsi que la différenciation et la spécification des cellules sensorielles notamment les cellules ciliées, comme expliqué dans la **figure 10**. Le but de mon travail de thèse est de mimer le développement de l'OI *in vitro*, afin de générer des cellules ciliées à partir de cellules souches pluripotentes induites humaines, en agissant sur les différentes voies de signalisation cités précédemment.

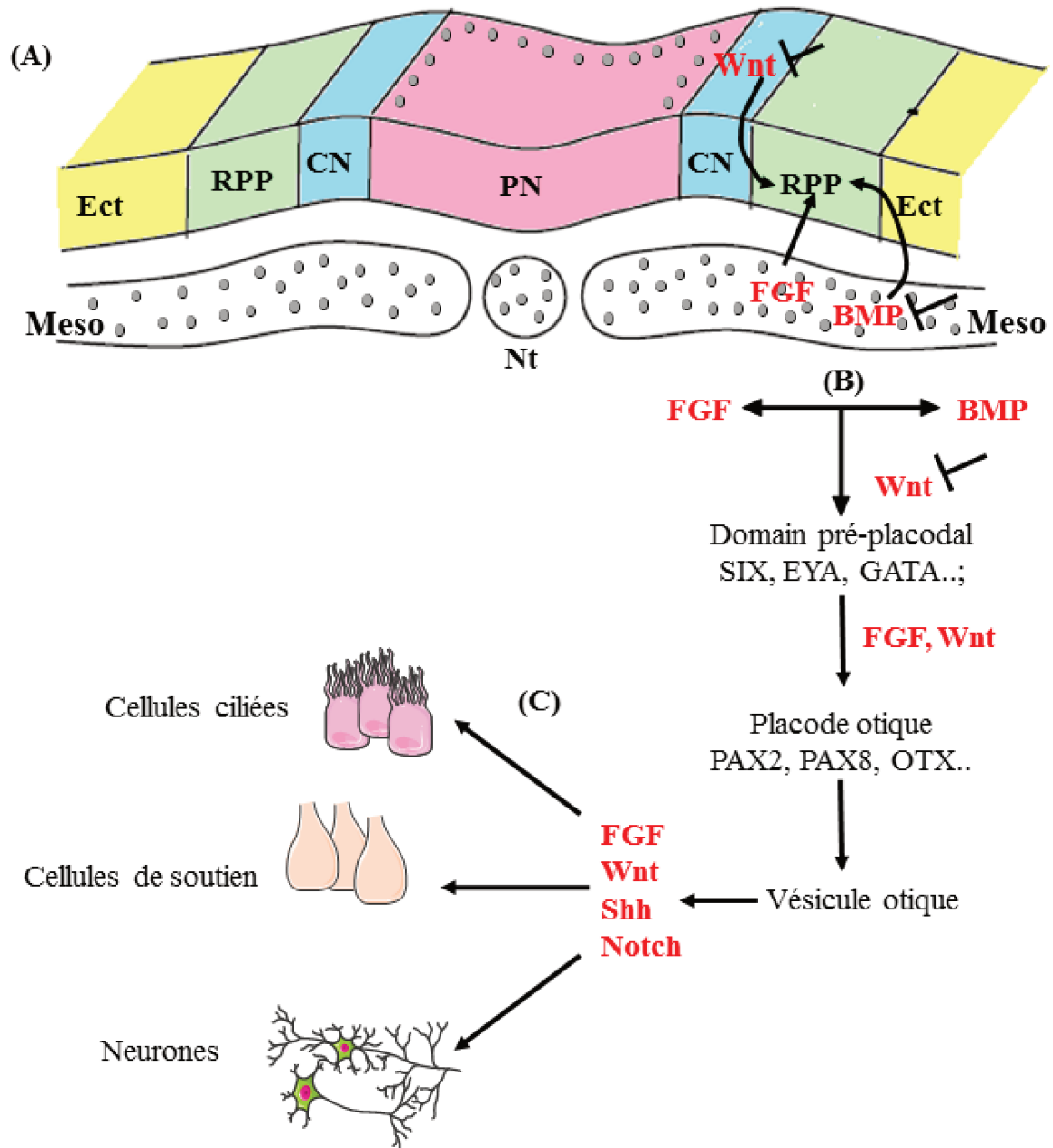


Figure 10: Induction de la placode otique et des cellules neurosensorielles

(A) Le diagramme illustre la structuration de l'ectoderme précoce. Ect : ectoderme, RPP : région pré-placodale, CN : crête neurale, PN : placode neurale, Meso : mesoderme, Nt: notochorde. (B) Les signaux BMP et FGF émanant du mésoderme, et Wnt, provenant de la crête neurale, induisent la formation de la région pré-placodale, à l'origine de la placode otique. Cette dernière s'invagine et donne la vésicule otique, qui sous l'effet de plusieurs signaux, donnera naissance aux cellules sensorielles (C).

Durant la formation de la cochlée, la spécification des cellules ciliées et des cellules de soutien est contrôlée par l'expression de marqueurs qui leur confèrent l'identité otique, en particulier ceux appartenant aux familles pou et myosine. (Driver and Kelley, 2009; Fritzsich and Straka, 2014; Kelley, 2006a) En outre, lorsqu'on parle des CC, le premier facteur de transcription qui vient à l'esprit est Atoh1 anciennement appelé Math1. Appartenant à la famille bHLH (*basic helix-loop-helix*), ce facteur de transcription a un rôle majeur dans l'initiation de la spécification des CC et dans leur survie (Chonko et al., 2013a). En effet, chez la souris, la délétion d'Atoh1 engendre une absence totale de cellules ciliées et de cellules de soutien. Inversement, sa surexpression induit l'apparition de cellules surnuméraires ectopiques (Bermingham et al., 1999; Chen et al., 2002). Plusieurs études montrent que l'expression d'Atoh1 est régulée par la signalisation Notch. Cette voie est impliquée non seulement dans l'expression de l'Atoh1, mais elle est considérée comme l'une des voies majeures impliquées dans la spécification et le devenir des cellules otiques, elle a à la fois un rôle dans la différenciation des CC et des cellules de soutien via plusieurs mécanismes décrits précédemment, notamment l'inhibition latérale (Kelley, 2006b; Ren et al., 2016; Su et al., 2015; Zhao et al., 2011; Zine et al., 2000).

3. Surdités neurosensorielles

Le système auditif peut subir des perturbations d'origine endogène ou exogène capables de provoquer une perte d'audition, ou surdité. La perte auditive peut être partielle ou totale, bilatérale ou unilatérale, et peut survenir à tous les âges. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, 360 millions de personnes dans le monde souffrent de déficits auditifs modérés ou profonds, dont 32 millions sont des enfants. On distingue plusieurs types de surdités qui diffèrent en fonction de la partie de l'organe lésée, la cause, l'âge d'apparition et l'ampleur de la perte auditive.

3.1. Surdités de transmission et surdités neurosensorielles

Selon la **localisation de la lésion**, les surdités sont divisées en deux classes : *surdités de transmission* et *surdités de perception* (ou *neurosensorielles*). Les surdités de transmission résultent d'anomalies structurelles de l'oreille externe (pavillon et conduit auditif) ou de l'oreille moyenne (cavité tympanique et ses trois osselets), qui entravent la conduction du son vers l'OI. Ce type de surdité baisse généralement le niveau sonore, c'est-à-dire diminue la capacité à entendre les sons faibles, et peut souvent être corrigé par un traitement médical ou chirurgical. En revanche, le deuxième type de surdité ou les surdités de perception, consistent

en une atteinte de la portion auditive de l'OI, la cochlée ou, plus rarement, les structures nerveuses qui traitent les signaux électriques délivrés par cet organe sensoriel et les acheminent jusqu'au cortex auditif. Malheureusement, les surdités neurosensorielles sont irréversibles, elles causent une perte auditive permanente non soignable ni par médicalement ni par chirurgie. Cependant, afin d'améliorer la qualité de vie de ces patients, des appareils ou des prothèses auditives peuvent être prescrits. Enfin, certaines surdités sont mixtes : elles comportent à la fois une composante de transmission et une composante de perception.

3.2. Surdités syndromiques et isolées

Selon **la cause**, une surdité peut être syndromique ou isolée (non syndromique), selon qu'elle est associée ou non à d'autres anomalies. Les surdités syndromiques sont, le plus souvent, congénitales. Elles sont dues, pour la plupart, au développement anormal des différents compartiments de l'oreille. Elles sont associées à d'autres anomalies rénales, cardiaques, musculaires, etc. Parmi ces surdités, on trouve le syndrome d'Usher, où les patients souffrent également d'une rétinite pigmentaire (Boëda et al., 2002; El-Amraoui et al., 2005), ou encore le syndrome de Jervell et Lange-Nielsen, responsable de 1% des surdités héréditaires, qui s'accompagne d'une malformation cardiaque (Cusimano et al., 1991).

Les surdités isolées, quant à elles, peuvent être héritées ou acquises. Elles sont dues soit à des facteurs environnementaux, par exemple l'exposition à des bruits intenses, la prise de médicaments ototoxiques (antibiotiques de la classe des aminoglycosides) et certaines infections, soit à des atteintes géniques, presque exclusivement monogéniques (dues à la mutation d'un seul gène). Par convention, les formes isolées de surdité héréditaire sont classées selon leur mode de transmission: DFNA, DFNB et DFN désignant respectivement des formes de surdité transmises suivant un mode autosomique dominant, récessif ou lié au chromosome X. Un numéro est ensuite attribué par ordre de découverte (Hardelin et al., 2004; Schrijver, 2004). A l'heure actuelle, 185 loci ont été identifiés comme responsables des surdités non syndromiques ou isolées : 67 DFNA, 105 DFNB, 6 DFN et 7 mutations correspondant à des anomalies du génome mitochondrial (<http://hereditaryhearingloss.org/> consulté le 12/08/2017). Parmi ces loci, on trouve par exemple DFNA11 et DFNA15, liés à une mutation des gènes codant, respectivement, pour la myosine MYO7A et pour le facteur de transcription POU4F3 (Liu et al., 1997; Vahava et al., 1998). La découverte des gènes responsables des surdités et la compréhension des mécanismes physiopathologiques de ces maladies ont fait naître de nouveaux espoirs pour trouver d'autres thérapies. Durant les dernières décennies, la thérapie

génique a grandement progressé vers le traitement des surdités neurosensorielles. Cette approche offre la possibilité de manipuler les gènes déficitaires dans l'organe auditif, soit en empêchant l'expression de l'allèle muté, soit en rétablissant l'expression du gène défectueux (Meyer et al., 2013). En outre, les récents essais cliniques de thérapie cellulaire contre les maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer (<http://www.clinicaltrials.gov>), ont suscité une grande curiosité concernant l'utilisation des cellules souches dans l'oreille. Ainsi, les chercheurs ont mis en place des protocoles permettant d'orienter la différenciation des cellules souches en progéniteurs otiques afin de régénérer des cellules sensorielles endommagées. Nous verrons dans la section suivante quels sont les différents types des cellules souches envisagées pour une utilisation dans l'oreille, comment ces cellules sont capables de se différencier *in vitro* en cellules otiques et comment elles pourraient restaurer les fonctions auditives *in vivo*.

4. Vers une médecine régénérative de l'oreille

4.1. Régénération des cellules ciliées chez les mammifères

Chez l'homme, le système auditif atteint sa maturité et devient fonctionnel dès la vie fœtale ; ainsi, on dénombre en moyenne 3500 CCI et 12 000 CCE dans une cochlée différenciée humaine, dès le 5^{ème} mois de gestation. Ce nombre reste étonnamment faible par rapport à la mission qu'accomplissent ces cellules, d'autant plus qu'elles peuvent facilement être endommagées suite à des agressions endogènes ou exogènes expliquées dans la section précédente. Chez les oiseaux, les cellules endommagées sont capables de régénérer spontanément à tout âge (Corwin and Cotanche, 1988; Ryals and Rubel, 1988). En revanche, chez les mammifères, pour des raisons encore mal connues, la perte des CC est malheureusement irréversible, leur régénération spontanée demeure impossible, et les déficits auditifs occasionnés sont définitifs.

En fait, un faible potentiel régénératif des CC a pu être observé provisoirement mais il reste insuffisant pour induire une récupération fonctionnelle complète (Almeida-Branco et al., 2015; Atkinson et al., 2015, 2015). Chez les mammifères, les cellules de soutien de l'organe de Corti, qui entourent les CC et qui expriment *Lgr5*, sont capables de réactiver leur cycle cellulaire pour rentrer en division et se différencier. Les cellules résultant de cette division mitotique lorsqu'elles sont transférées dans un environnement approprié, elles se transdifférencient et prolifèrent en CC pour substituer les cellules endommagées (Chen et al., 2012). Cependant,

cette capacité de régénération est limitée puisqu'elle a été observée uniquement dans la cochlée de souris nouveau-née (endommagée par un agent ototoxique) et non pas dans une cochlée mature. Le nombre de CC régénérées était plus important en présence d'un inhibiteur de la voie Notch (Bramhall et al., 2014; Mizutani et al., 2013). Ce faible potentiel régénératif intrinsèque des CC avait été observé auparavant dans des utricules de cobaye (Forge et al., 1993; Warchol et al., 1993) mais aucune régénération cellulaire fonctionnelle n'a été détectée chez les adultes.

Malgré les similitudes entre l'organe auditif des mammifères et celui des oiseaux et la présence de cellules de soutien Lgr5+ dans l'organe de Corti chez les mammifères adultes, ces cellules souches / progénitrices cochléaires quiescentes sont incapables de se régénérer d'une façon permanente. La disparition de ce potentiel régénératif des cellules de soutien pourrait s'expliquer par le manque de signaux ou de facteurs de croissance leur permettant de se différencier spontanément. Par conséquent, les cellules de soutien seraient incapables de réactiver leur cycle cellulaire indéfiniment et de se diviser *in vivo* en réponse à la perte des CC.

4.2. Les cellules souches pour le traitement des surdités neurosensorielles

La compréhension des bases génétiques et moléculaires qui sous-tendent le développement de ces CC a permis de mettre au point de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à restaurer la fonction auditive. Comme les signaux qui contrôlent l'organogenèse lors du développement sont souvent impliqués dans les processus de régénération tissulaire, l'idée a émergé de manipuler ces signaux pour développer de nouvelles thérapies « cellulaires » contre les surdités neurosensorielles.

La thérapie cellulaire, ou transplantation des cellules souches, s'appuie sur le remplacement ou la régénération des cellules « malades » ou dysfonctionnelles par des cellules saines et fonctionnelles. Cette thérapie est souvent basée sur l'utilisation de cellules souches, douées d'auto-renouvellement et d'une capacité à donner naissance aux différents types de cellules de l'organisme. Cette nouvelle technologie constitue un outil d'avenir qui semble prendre de plus en plus d'importance, même si la majorité des travaux effectués dans ce domaine sont encore de nature expérimentale. Cependant, l'utilisation des cellules souches pourrait poser un certain nombre de problèmes éthiques et techniques liés notamment à leur disponibilité ou à l'utilisation d'immunosuppresseurs. Ainsi, il est nécessaire d'évaluer de nouveaux candidats, notamment des cellules souches adultes comme les cellules souches pluripotentes induites (iPSC), qui pourraient être obtenues de manière peu invasive chez tous les individus dans le but de réaliser des transplantations autologues, contournant le problème

de l'immunosuppression. Dans cette section seront présentés les différents types de cellules souches, leurs caractéristiques et limites, leur potentiel de différenciation en progéniteurs otiques *in vitro* ainsi que leur capacité à restaurer les fonctions auditives *in vitro*.

4.2.1. Les cellules souches

Les cellules souches partagent un ensemble de propriétés communes, elles sont douées d'auto-renouvellement et ont la capacité de donner naissance à une descendance cellulaire, qui lorsqu'elle est placée dans des conditions appropriées et soumise aux signaux adéquats, peut générer des cellules progénitrices capables de se différencier en plusieurs types cellulaires. En fonction de leur capacité de différenciation, on distingue plusieurs types de cellules souches (**Figure 11**).

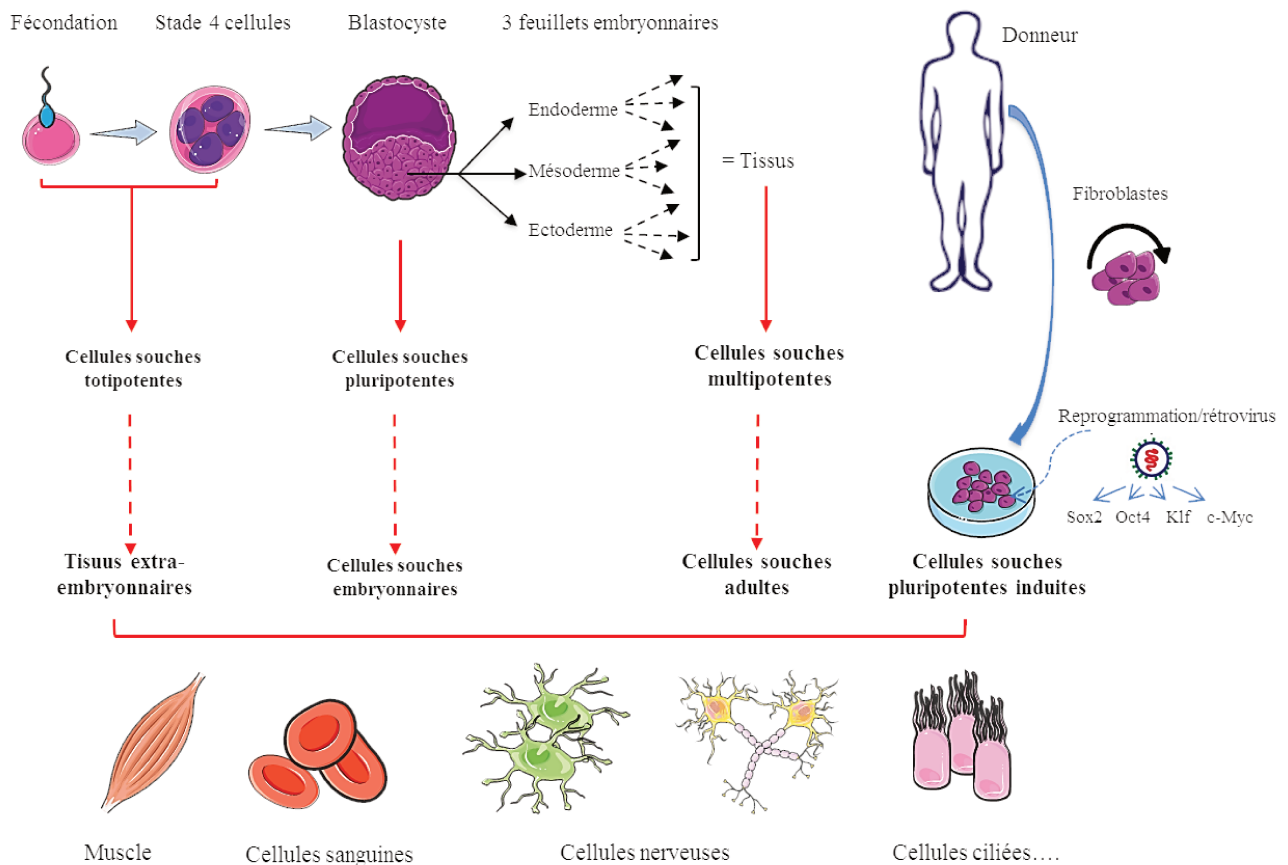


Figure 11 : Les différents types de cellules souches (images tirées de servier medical art).

4.2.1.1. *Les cellules souches totipotentes*

Ces cellules souches sont d'origine embryonnaire, formées juste après la fécondation, jusqu'au stade huit cellules. Autrement dit, ces cellules sont issues des trois premières divisions mitotiques embryonnaires, ce sont les seules à pouvoir donner naissance à un organisme entier.

4.2.1.2. *Les cellules souches pluripotentes*

Les cellules souches pluripotentes : elles aussi d'origine embryonnaire, elles proviennent de la masse cellulaire interne du blastocyste. Ce type de cellules souches a la capacité de se différencier en cellules de n'importe lequel des trois feuillets embryonnaires, y compris les cellules germinales. Cependant, elles ne sont plus capables à elles seules d'aboutir à la formation d'un organisme entier, puisqu'elles ne peuvent pas générer les annexes embryonnaires. Cette pluripotentialité a été démontrée lors de la réimplantation de cellules souches embryonnaires cultivées *in vitro* dans un blastocyste hôte. Le suivi des cellules implantées exprimant un gène marqueur (LacZ ou GFP) montre que celles-ci participent à la formation des différents tissus du souriceau chimère, y compris la lignée germinale (Bradley et al., 1984).

4.2.1.3. *Les cellules souches multipotentes*

Ces cellules sont présentes dans l'organisme adulte et sont capables de produire plusieurs types cellulaires dérivés d'un seul feuillet embryonnaire (si elles ne génèrent qu'un type cellulaire, on les dit unipotentes). Elles permettent de générer les cellules d'un organe particulier, puisqu'elles sont déjà engagées dans un programme tissulaire spécifique. C'est le cas des cellules souches hématopoïétique de la moelle osseuses connues pour leur capacité de renouveler toutes les cellules sanguines.

Pour résumer, selon leur origine, les cellules souches se divisent en deux grandes classes : les cellules souches embryonnaires (ESC) et les cellules souches adultes (ASC). Aux potentialités différentes, ces cellules constituent une niche inépuisable dans une perspective de médecine régénératrice. En revanche, leur utilisation en vue d'une thérapie chez l'homme pourrait poser de nombreux risques. Les ESC par exemple, malgré l'importance de leur potentiel régénératif et leur capacité à se différencier dans tous les tissus de l'organisme, sont difficiles d'accès et pourraient poser des problèmes éthiques et techniques liés notamment à leur disponibilité. En outre, leur instabilité lorsqu'elles sont injectées dans un organisme adulte

pourrait engendrer leur transformation en cellules tumorales, ou des problèmes immunologiques et des risques de rejet. Les ASC, quant à elles, peuvent être obtenues sans porter préjudice ou nuire à l'intégrité physique de l'individu. Malgré qu'elles aient une potentialité beaucoup plus restreinte que les ESC, les cellules souches adultes ont déjà fait l'objet de greffes autologues chez l'homme, comme les cellules souches hématopoïétiques pour le traitement de la leucémie (Simancikova et al., 2017), ou encore les cellules souches olfactives dans le cas des accidents vasculaires cérébrales (<http://www.clinicaltrials.gov>).

4.2.1.4. *Les cellules souches pluripotents induites (iPSC)*

Depuis 2006, une nouvelle catégorie de cellules souches est apparue : les **cellules souches pluripotentes induites** (*induced pluripotent stem cells, iPSC*). Les iPSC sont des cellules adultes déprogrammées et présentant des caractéristiques et un potentiel similaires aux cellules souches embryonnaires. La découverte des iPSC par Yamanaka et al leur a valu le prix Nobel de médecine en 2012 et constitue d'ores et déjà une piste importante dans la médecine régénératrice. Les iPSC sont issues de la reprogrammation de cellules adultes différenciées (fibroblastes) par l'introduction des quatre gènes Sox2, Oct4, cMyc et Klf4 grâce à des rétrovirus (Takahashi et al., 2007; Welstead et al., 2008; Wernig et al., 2007). Ces cellules deviennent capables de s'auto-renouveler indéfiniment et de se métamorphoser à la demande en toute autre cellule de l'organisme. Les iPSC pourraient être obtenues de manière peu invasive chez tous les individus dans le but de réaliser des transplantations autologues. Les iPSC pourraient donc constituer une révolution dans le domaine de la thérapie cellulaire, permettant de s'affranchir des limites éthiques des ESC. Bien que prometteuse, cette méthode, dont le potentiel est encore très théorique, pose un problème sanitaire pour une application médicale à cause de l'utilisation de rétrovirus et d'oncogènes. Cependant, l'intérêt des iPSC reste majeur, non seulement en raison de leur intérêt potentiel en thérapie cellulaire, mais aussi comme outils de criblage pharmacologique ou toxicologique, ou comme modèles de pathologies humaines. On peut en effet déprogrammer des cellules somatiques de patients atteints de maladies génétiques variées. En outre, elles permettront de disséquer les mécanismes génétiques et épigénétiques établissant l'état de pluripotence d'une cellule (Ebert et al., 2012; Kanherkar et al., 2014).

4.2.2. *La thérapie cellulaire pour les surdités neurosensorielles*

Au cours des dernières décennies, les cellules souches, d'origine embryonnaire (Thomson et al., 1998) ou obtenues par reprogrammation (Takahashi et al., 2007), représentent

de nouvelles pistes pour le traitement des surdités neurosensorielles. Grâce à leur pluripotence et leur capacité d'auto-renouvellement, les cellules souches constituent une source inépuisable pour la production *in vitro* de progéniteurs otiques et de leurs dérivés, y compris les CC. D'ailleurs, plusieurs études ont montré que les cellules souches embryonnaires et adultes sont capables de se différencier *in vitro* en progéniteurs otiques qui, lorsqu'elles sont greffées *in vivo*, étaient capable de restaurer les fonctions auditives (Chen et al., 2012; Hildebrand et al., 2005; Hu et al., 2005; Pandit et al., 2011; Xu et al., 2016).

La génération de progéniteurs otiques *in vitro* à partir de cellules souches a été rendu possible grâce à la compréhension des mécanismes moléculaires et génétiques impliqués dans le développement de l'oreille *in vivo*. En effet, pour régénérer des CC, on peut imaginer récapituler les étapes du développement de l'OI *in vitro*, en agissant sur les différentes voies de signalisation nécessaires au phénotype otique, comme les voies FGF, Wnt, Notch, BMP... (Chen et al., 2012; Costa et al., 2015; DeJonge et al., 2016; Dincer et al., 2013; Koehler et al., 2013, 2017; Ronaghi et al., 2014).

Citation	Journal	Used cells	Method	Pathways	Timing	Generated cells	Hair cell bundle	Electrophysiology
(Oshima et al., 2010)	<i>Cell</i>	mESCs miPSCs	2D	FGF, Wnt, TGF- β	20 <i>div</i>	Hair cell-like cells	Yes	Yes
(Chen et al., 2012)	<i>Nature</i>	mESCs	monolayer	FGF	26 \rightarrow 40 <i>div</i>	Hair cell-like cells sensory neuron-like cells	Disorganized	Yes
(Ronaghi et al., 2014)	<i>Stem cell and development</i>	mESCs	2D	FGF, Wnt, TGF- β , BMP	42 <i>div</i>	Hair cell-like cells and supporting cells	Disorganized	Not done
(Ealy et al., 2016)	<i>PNAS</i>	hiPSCs hESCs	2D	FGF, Wnt, TGF- β , BMP, AR	18 <i>div</i>	Otic progenitors	Not shown	Not done
(Koehler et al., 2013)	<i>Nature</i>	mESCs	3D	FGF, Wnt, TGF- β , BMP	12 \rightarrow 30 <i>div</i>	Otic vesicles, hair cell like-cells	Yes	Yes
(DeJonge et al., 2016)	<i>Plos one</i>	mESCs	3D	FGF, Wnt, TGF- β , BMP	12 \rightarrow 28 <i>div</i>	Otic vesicles, hair cell like-cells	Yes	Yes
(Koehler et al., 2017)	<i>Nature biotechnology</i>	hiPSCs hESCs	3D	FGF, Wnt, TGF- β , BMP	12 \rightarrow 150 <i>div</i>	Otic vesicles, hair cell like-cells	Yes	Yes

Tableau 1 : Récapitulatif des études pionnières de différenciation *in vitro* des cellules souches en cellules otiques en utilisant différentes méthodes de culture cellulaire.

Les travaux majeurs de différenciation des cellules souches en cellules otiques sont résumés dans le **tableau 1**. On remarque que la plupart des protocoles existants sont issus de SC embryonnaires murines ou humaines. Alors que les études du potentiel de différenciation des cellules souches adultes, en particulier des iPSC humaines (**Tableau 2**), sont rares. Ce n'est que dans la dernière décennie que quelques chercheurs ont commencé à étudier le potentiel thérapeutique des iPSC humaines pour les surdités neurosensorielles, ce que récapitule le tableau ci-dessous.

Groupe	Année	Journal	But de l'étude	Références
Hashino	2017	<i>Nature Biotechnology</i>	Différenciation 2D des hiPSC en CC	(Koehler et al., 2017)
Heller	2016	<i>PNAS</i>	Différenciation en 3D des hiPSC en CC	(Ealy et al., 2016)
Wang	2016	<i>Stem cells translational medicine</i>	Correction génétique de la Myo7a	(Tang et al., 2016)
Wang	2016	<i>Cell death and differentiation</i>	Correction génétique de la Myo15a	(Chen et al., 2016)
Omri	2016	<i>Acta Oto-Laryngologica</i>	Différenciation des hiPSC en neurones du ganglion spiral	(Taura et al., 2016a)
Nakagawa	2015	<i>Neuroscience Letters</i>	Différenciation en monocouche des hiPSC en CC	(Ohnishi et al., 2015)
Nayagam	2014	<i>BioResearch Open Access</i>	Différenciation des hiPSC en progéniteurs neuronaux	(Gunewardene et al., 2014)

Tableau 2 : Etudes ayant différencié des hiPSC en cellules otiques *in vitro*

On dénombre très peu de travaux sur la différenciation otique des iPSC humaines, parmi lesquels celui d'Ealy et ses collaborateurs. Dans cette étude, les chercheurs ont comparé le potentiel de différenciation en progéniteurs otiques de deux types de cellules souches : les ESC et les iPSC humaines. Les cellules ont été cultivées dans un système 2D, en présence de modulateurs des voies Wnt, BMP, FGF et TGF- β . Ces travaux ont montré que les deux lignées étaient capables de se différencier en progéniteurs otiques après 18 jours d'induction (Ealy et al., 2016). Une autre étude très récente de l'équipe Hashino confirme ces résultats en utilisant aussi les ESC et des iPSC humaines (Koehler et al., 2017). A la différence de la première étude, dans celle-ci, les cellules ont été cultivées en 3D. Cette méthode de culture a l'avantage de fournir un environnement plus réaliste, d'un point de vue physiologique, auquel sont confrontées les cellules dans l'organisme contrairement à la culture cellulaire en 2D. Elle a

montré que les cellules exprimaient non seulement des marqueurs de la placode otique à J18, mais aussi des marqueurs de CC notamment MYO7A et ESPN après une différenciation à long terme allant jusqu'à 150 jours. (Koehler et al., 2017).

Mon travail de thèse s'est inscrit dans le cadre de ces recherches, l'objectif de mon projet de thèse était de trouver un protocole fiable, permettant la différenciation des iPSC humaines en CC et qui serait adapté à la thérapie cellulaire au niveau de l'oreille chez l'homme. Pour cela, nous avons choisi d'étudier leur potentiel de différenciation otique en utilisant une approche plus simple, la « **culture en monocouche** » (*monolayer*). Contrairement aux deux autres techniques, la culture en monocouche constitue un système de culture très facile à manipuler et très commode à visualiser en imagerie. De plus, cette approche permet d'isoler un type cellulaire, au moment du repiquage, de façon à pouvoir le tester indépendamment de ses partenaires habituels. Il est aussi possible de réaliser des co-cultures de plusieurs types cellulaires afin de suivre les interactions cellule/cellule.

5. Objectifs

Le rôle primordial des voies de signalisation FGF, Wnt, Notch, Shh, et BMP dans le développement de l'OI, est bien décrit dans la littérature. Comme nous l'avons expliqué dans les sections précédentes, ces voies communiquent entre elles d'une façon permanente et induisent la formation de la placode otique ainsi que la différenciation et la spécification des cellules sensorielles notamment les cellules ciliées. Cependant, si leur rôle est bien établi dans le développement *in vivo* de l'OI, leur rôle exact *in vitro* reste encore mal connu, notamment lorsque veut générer des cellules otiques à partir de cellules souches. En effet, les protocoles de différenciation otique existants sont contradictoires et demeurent insatisfaisants : personne n'a encore réussi à obtenir une population homogène exprimant exclusivement des marqueurs otiques.

Ainsi, le but mon travail de thèse était d'étudier les mécanismes de différenciation des cellules souches pluripotentes induites humaines en progéniteurs otiques (**Figure 12**). Mon objectif principal était de déterminer les conditions optimales permettant d'améliorer la pureté des progéniteurs et d'obtenir une population homogène de cellules otique en grand nombre. Pour évaluer l'efficacité et la reproductibilité des différents protocoles testés, plusieurs lignées d'hiPSC ont été utilisées. Le phénotype des cellules générées a été examiné en utilisant

différentes techniques complémentaires allant de la biologie moléculaire (qPCR, Fluidigm, RNAseq) jusqu'à l'immunocytochimie.

Au début de ma thèse, j'ai contribué à des études pour mieux comprendre l'implication de la voie NOTCH au cours de la différenciation des hiPSC en cellules otiques. Des travaux antérieurs de mon équipe d'accueil avaient montré l'implication cette voie dans la régénération des cellules ciliées *in vivo* : ils ont montré que l'inhibition de cette voie avec la GSI (gamma-secretase-inhibitor) induisait une différenciation des cellules ciliées (Savary et al., 2008; Zine, 2003; Zine et al., 2000, 2001). Cela nous a menés à nous demander si cette inhibition aurait le même effet *in vitro*. Si oui, à quel moment faudrait-il inhiber cette voie ? Quelle est la concentration à utiliser ? Quelle est la durée de traitement optimale qui induirait le meilleur effet sans être toxique ? La réponse à toutes ces questions a fait l'objet de mon premier article, intitulé : ***Modulation of Notch pathway enhances inner ear otic sensory cell differentiation from human induced pluripotent stem cells.***

Par la suite, afin d'améliorer encore plus mon protocole d'induction, je me suis intéressée à d'autres voies de signalisation, notamment la voie Wnt et son rôle dans l'induction de la placode otique et la spécification des cellules ciliées. Ce travail sera résumé dans mon deuxième article, intitulé : ***Modulating FGF, TGF- β and WNT signaling pathways to differentiate human induced pluripotent stem cell into hair cell-like cells.***

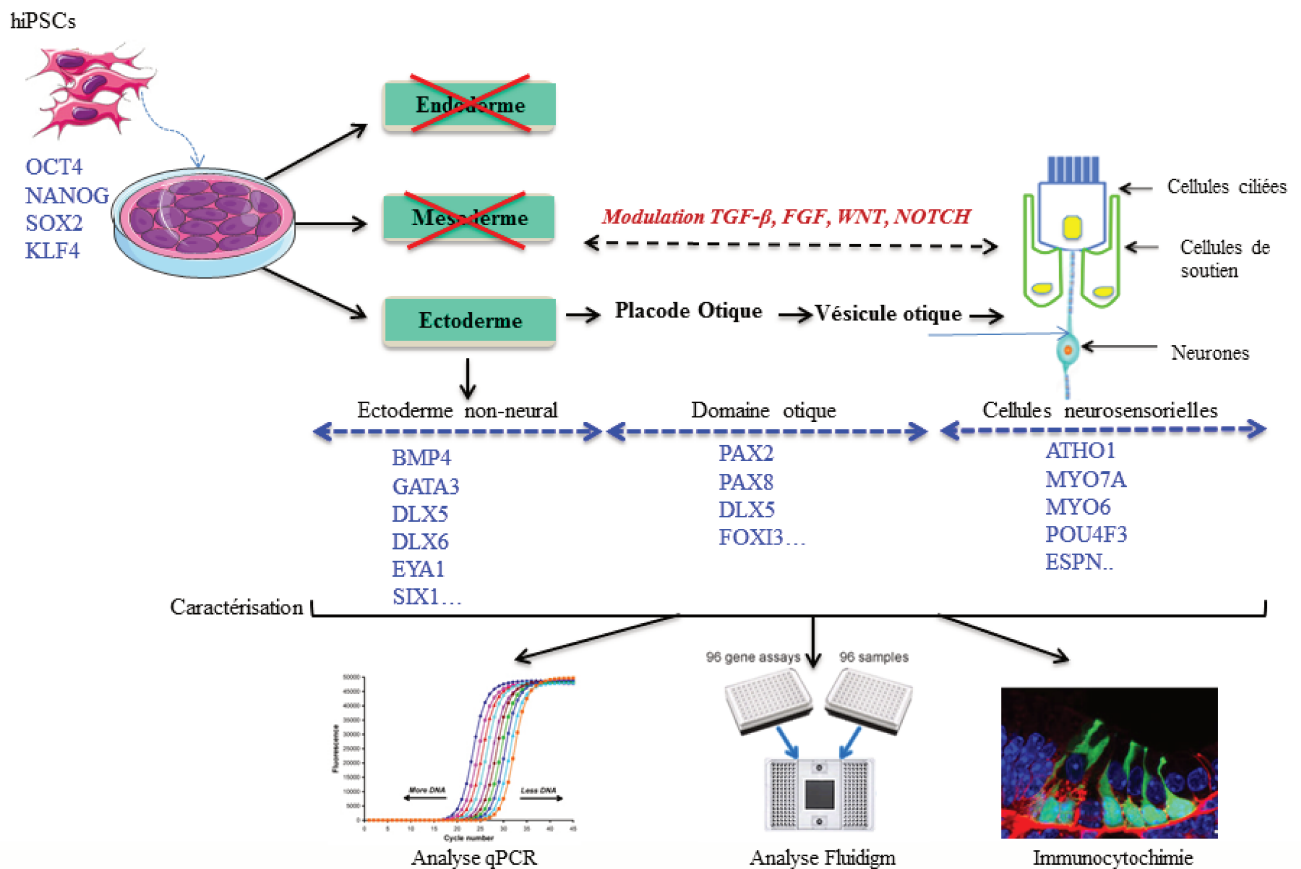


Figure 12: Stratégie de différenciation des cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC) en cellules otiques

Après caractérisation de la pluripotence de nos cellules, elles ont été différenciées en cellules otiques selon plusieurs étapes. Débutant d'abord par l'induction de l'ectoderme et du domaine pré-placodal. Ensuite, la formation de la placode otique puis la vésicule otique. Enfin, la spécification des cellules sensorielles notamment les cellules ciliées. Durant ce processus, nous avons modulé plusieurs voies de signalisation, impliquées dans le développement de l'oreille interne in vivo, en particulier la voie FGF, TGF-β, WNT et NOTCH. Afin d'examiner le devenir de nos cellules, nous avons exploré l'expression des marqueurs otiques, caractéristiques de chaque stade de développement (flèches bleues), par qPCR, par Fluidigm et par immunocytochimie.

RESULTATS

1. Rôle de la voie Notch dans la différenciation des hiPSC en cellules ciliées

1.1. Objectifs de l'étude

Quelle que soit sa cause, la surdité neurosensorielle est bien souvent liée à la perte irréversible des cellules sensorielles, notamment les cellules ciliées. Les déficits auditifs qui en résultent sont définitifs et aucune thérapie n'existe actuellement pour corriger ces surdités ; le seul moyen pour y remédier est d'utiliser des prothèses auditives ou des implants cochléaires.

Au cours des dernières années, la compréhension des bases génétiques et moléculaires qui sous-tendent le développement des cellules ciliées, en plus de la découverte des cellules souches, ont permis la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à régénérer les cellules ciliées endommagées et à restaurer la fonction auditive. Ainsi, un grand pas vient d'être franchi dans la définition des conditions permettant d'isoler, de cultiver et de différencier des cellules souches embryonnaires et des cellules reprogrammées, en cellules ciliées mécanosensibles. Cependant, les protocoles de différenciation existants demeurent insatisfaisants et controversés, notamment par rapport aux voies de signalisations nécessaires à la spécification des cellules ciliées.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude du rôle de la voie Notch dans la régénération des cellules ciliées. Nous présentons un nouveau protocole de différenciation des cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC) en cellules ciliées. L'approche expérimentale consiste à différencier les hiPSC en monocouche en deux étapes. Pour induire la formation des progéniteurs ciliés, les hiPSC sont d'abord cultivées sur une matrice extracellulaire (laminine) pendant 13 jours sous traitement FGF3 / FGF10. Ensuite, les cellules obtenues sont transférées sur un nouveau support (gélatine) et cultivées pendant une semaine en présence soit d'AR+EGF, soit d'un inhibiteur de la voie Notch. Enfin, les cellules sont collectées à différents temps pour examiner leur phénotype. Les analyses immunocytochimiques et quantitatives des marqueurs ciliés montrent que l'inhibition tardive de la voie Notch favorise la différenciation des hiPSC en cellules ciliées. Ce travail confirme l'importance de la voie Notch dans la différenciation des hiPSC en CC, et a fait l'objet d'un premier article, que nous venons de soumettre pour publication.

Article N°1: Modulation of Notch pathway enhances inner ear otic sensory cell differentiation from human induced pluripotent stem cells

Stem Cells and Development

Stem Cells and Development

Stem Cells and Development: <http://mc.manuscriptcentral.com/scd>

Modulation of Notch Pathway Enhances Inner Ear Otic Sensory Cell Differentiation from Human Induced Pluripotent Stem Cells

Journal:	<i>Stem Cells and Development</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Research Report
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Lahlou, Hanae; CNRS UMR 7260, Neurosciences Integratives et Adaptatives Lopez-Juarez, Alejandra; CNRS UMR 7260, Neurosciences Integratives et Adaptatives Fontbonne, Arnaud; CNRS UMR 7260, Neurosciences Integratives et Adaptatives Nivet, Emmanuel; CNRS UMR 7259, Neurobiologie des Interactions Cellulaires et Neurophysiopathologie, Zine, Azel; CNRS UMR 7260, Neurosciences Integratives et Adaptatives; Universite de Montpellier, Faculté de Pharmacie
Keyword:	Development Systems, Embryonic Development, Differentiation, Induced Pluripotent, Patterning
Manuscript Keywords (Search Terms):	pluripotent stem cells,, inner ear, gene expression analysis, posterior placode progenitors, late sensory otic cells
Abstract:	The inner ear represents a promising system to develop cell-based therapies from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). In the developing inner ear, Notch signaling plays multiple roles to specify otic sensory regions and for further cell fate determination. Optimizing hiPSC induction for the generation of appropriate number of otic progenitors and derivatives, such as hair cells, may provide an unlimited supply of cells for research and cell-based therapy. In this study, we used monolayer cultures, exposure to otic-inducing agents, Notch signaling modulation, and cell type marker expression analysis to track early and late otic sensory lineages during hiPSC differentiation. We first derived otic/placodal progenitors in a medium supplemented with FGF3/FGF10 over 13 days. The generated progenitor cells were treated for 7 days with retinoic acid (RA) and epidermal growth factor (EGF) or a Notch inhibitor. Differentiated cultures were analyzed in parallel by quantitative RT-PCR and immunocytochemistry. After 13 days, hiPSC-derived cells upregulated a panel of otic/placodal markers. Strikingly, a subset of these induced progenitor cells displayed key-late otic markers in cultures under Notch inhibition as compared to RA/EGF-treated cultures. Our results show that modulating Notch pathway during in vitro differentiation of hiPSC-derived otic/placodal progenitors is a valuable strategy to promote the expression

Mary Ann Liebert Inc., 140 Huguenot Street, New Rochelle, NY 10801

Modulation of Notch Pathway Enhances Inner Ear Otic Sensory Cell Differentiation from Human Induced Pluripotent Stem Cells

Hanae Lahlou¹, Alejandra Lopez-Juarez¹, Arnaud Fontbonne¹, Emmanuel Nivet², Azel Zine^{1,3}

¹Aix Marseille Université, CNRS, LNIA UMR 7260, 13331, Marseille, France

²Aix Marseille Université, CNRS, NICN UMR 7259, 13916, Marseille, France

³Université de Montpellier, Faculté de Pharmacie, Montpellier, France

Correspondence : Prof. Azel ZINE, Ph.D.

Laboratoire des Neurosciences Intégratives et Adaptatives (LNIA)

CNRS UMR 7260

Aix-Marseille Université

3, Place Victor Hugo

13331 Marseille, France

Phone : +33(0)413550894

Abstract

The inner ear represents a promising system to develop cell-based therapies from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). In the developing ear, Notch signaling plays multiple roles to specify otic regions and for further cell fate determination. Optimizing hiPSC induction for the generation of appropriate number of otic progenitors and derivatives, such as hair cells, may provide an unlimited supply of cells for research and cell-based therapy. In this study, we used monolayer cultures, otic-inducing agents, Notch modulation, and marker expression to track early and late otic sensory lineages during hiPSC differentiation. We first derived otic/placodal progenitors in a medium supplemented with FGF3/FGF10 over 13 days. These progenitor cells were treated for 7 days with retinoic acid (RA) and epidermal growth factor (EGF) or a Notch inhibitor. Differentiated cultures were analyzed in parallel by qPCR and immunocytochemistry. After 13 days, hiPSC-derived cells upregulated a panel of otic/placodal markers. Strikingly, a subset of these induced progenitor cells displayed key-late otic markers in cultures under Notch inhibition as compared to RA/EGF-treated cultures. Our results show that modulating Notch pathway during *in vitro* differentiation of hiPSC-derived otic/placodal progenitors is a valuable strategy to promote the expression of human late otic sensory lineage genes.

Introduction

Hearing loss and vestibular dysfunction have become the most common forms of sensory deficits [1]. The inner ear is a highly specialized sensory organ containing auditory and vestibular hair cells (HCs), which are located within specialized receptors that sense mechanical energy, generate electrical impulse and subsequent propagation of the signal to the central nervous system [2]. In the inner ear, HCs are derived from differentiation of early otic progenitor cells through precise temporally and spatially-coordinated gene expression patterns, this process is orchestrated by complex signaling cascades that ensure otic development [3, 4]. A normal human cochlea contains approximately 16,000 sensory HCs forming one row of inner HCs and three rows of outer HCs. In addition to their very limited number, these sensory cells are susceptible to damage from a variety of insults, ranging from aminoglycoside antibiotics to loud noise exposure, genetic mutations, or the effects of aging. In contrast to the avian cochlea able to regenerate lost HCs [5, 6], in mammals including humans, once lost, HCs are unable to regenerate and any resulting hearing loss is permanent. In the past few years, stem cell-based therapy approaches toward translating otic development to produce HCs from stem cells has received substantial interest in the field [7, 8].

The generation of replacement HCs from a renewable source of otic progenitor cells remains one of the principal requirements for the development of a cell-based therapy within the mammalian inner ear. It has previously been shown that murine embryonic stem cells (mESCs) are capable to differentiate toward an otic epithelial lineage *in vitro* [9–14]. Furthermore, initial studies with human embryonic stem cells (hESCs) revealed their ability to differentiate along an otic neurogenic lineage, giving rise to neurons with a partial functional restoration of HC innervation in an animal experimental model of auditory neuropathy [15, 16]. Although it has been previously reported that hESCs challenged with retinoic acid (RA), epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor-beta (TGF- β) and other growth factor ligands differentiated into HC-like cells with a rudimentary resemblance to native HCs, the efficiency of otic induction was limited. Accordingly, available differentiation protocols remain unsatisfactory and require further investigation to obtain higher yields of HCs. The complexity to reach this objective stems from the diversity of signaling pathways involved in inner ear development. Despite enormous progresses to unravel the signaling cascades governing late otic sensory progenitor differentiation, and their sequential orchestration during development, otic cell fate determination remains not fully understood yet. Therefore, one of the current challenges is to identify key developmental signaling pathways, as well as how and when they

have to be modulated, for the *in vitro* production of otic placodal progenitors and their further efficient differentiation into human late otic sensory cell fate.

To that end, human pluripotent stem cells, either from embryonic origin [17] or obtained by cell reprogramming [18], namely human induced pluripotent stem cells (hiPSCs), have received considerable attention as cellular platform for the *in vitro* production of a cell type of interest by recapitulating the developmental steps leading to otic cells. Indeed, thanks to their self-renewal and pluripotency features, they represent a suitable source for the *in vitro* generation of a large number of otic progenitors and their derivatives, including HCs. Moreover, in the future hiPSCs may serve as an autologous source of replacement for HCs and/or neurons in the injured inner ear, if their differentiation to early placodal/otic progenitors and late otic sensory lineage is first successful *in vitro*.

Among the molecular pathways that regulate otic specification and differentiation during embryonic development, the Notch signaling pathway is a critical player [19–24]. In addition, numerous studies have reported that Notch inhibition, in damaged cochlea, increases the conversion of inner ear stem cells to HCs by a mechanism that involves the upregulation of a bHLH transcription factor, *Atoh1* [25, 26]. This Notch signaling pathway is a highly conserved signaling system that regulates cell fate and development in a variety of tissue compartments in metazoans [27] and recently revealed to play a crucial role in the regulation of stem cell pathway [28, 29]. Overall, numerous data suggest that Notch inhibition is an important mechanism at play during otic specification and differentiation.

In this study, we investigated whether a disruption of the Notch signal pathway could affect the differentiation of hiPSCs into late otic sensory cells as compared to a previously reported RA/EGF treatment in adherent monolayer culture system [16]. To follow the generation of human inner ear otic cell-lineage, we monitored the expression of a comprehensive panel of early otic/placodal and late otic lineage markers in parallel by using quantitative real time-PCR (qPCR) and immunocytochemistry analyses. Our results show that modulating Notch pathway during the differentiation of hiPSC-derived otic progenitor-like cells is a valuable strategy to efficiently generate human inner ear late otic sensory cells *in vitro*. This work could provide the basis to better understand the mechanisms controlling human otic lineage differentiation and contribute towards developing a cell-based therapy approach for inner ear disorders.

2. Materials and Methods

2.1. hiPSCs Culture and Maintenance Method

The hiPSCs ChiPSC-4 line was provided by Cellartis Bioresearch (Göteborg, Sweden). This cell line was derived from fibroblasts of healthy human donors and reprogrammed by using polycistronic retrovirus technology, based on the transduction of Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc transcription factors [18, 30]. The hiPSCs were maintained using a proprietary feeder-free culture system, they were plated at a density of 40,000 -50,000 cells/cm² onto coated dishes with a DEF-CS™ COAT-1 matrix (1:20, Cellartis) diluted in D-PBS (+/+) (Gibco by Life Technologies). Cells were expanded in DEF-CS™ 500 basal medium, daily supplemented with DEF-CSTM GF-1 (1:333), GF-2 (1:1000) and GF-3 (1:1000) additives (Cellartis). When the cells were confluent at 80-90% (about 5-7 days), they were passaged using TrypLE Select® (Life Technologies). The cells grew very quickly, and in less than a week, we could proceed to the second passage, seeding the cells on a larger surface, and so on, until having several millions of cells. Then, they were frozen or differentiated into inner ear otic progenitors.

2.2. Early Otic Placode Induction

We performed initial otic placodal induction from hiPSCs using a monolayer culture system previously described for the differentiation of human embryonic stem cells (hESCs) into neuronal and epithelial cells [16]. In our study, undifferentiated hiPSCs, from passages 18-21, were seeded at 30,000 cells/cm² onto coated laminin flasks (1.5 µg/cm², R&D Systems). Cells were cultured in DFNB basal medium (DMEM/F12 with N2 and B27, Gibco® by Life Technologies), supplemented with Fibroblast growth factors, FGF3 (50 ng/ml) and FGF10 (50 ng/ml) (R&D Systems) from the first day until the end of the induction period (i.e. day-13). The medium was replaced every 2 days.

2.3. Late Otic Cell Differentiation

To induce differentiation into late otic cells, dissociated otic/placodal progenitors obtained from the initial otic induction were transferred onto gelatin coated flasks at 80,000 cells/cm² and cultured in DFNB medium, supplemented with either RA (1 mM, Sigma) and EGF (20 ng/ml; R&D Systems) or with a gamma-secretase inhibitor at 5 µM, i.e. difluorobenzeneacetamid (DBZ, clinical grade molecule, Tocris Bioscience). Exposure to either RA/EGF or DBZ was initiated from day-14 until day-20 and the medium was replaced every 2 days. At different

culture periods, qPCR and immunostaining were performed on differentiated cells and analyzed for the expression of early otic/placodal markers (i.e. PAX2, PAX8, DLX5, GATA3) and late otic (i.e. ATOH1, POU4F3, MYO7A) sensory markers.

2.4. Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-QPCR)

Total RNA was extracted from undifferentiated and differentiated cells using the PureLink[®] RNA Mini Kit (Life Technologies) according to manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 1 µg of RNA (per sample), using High-Capacity RNA-to-cDNA[™] Kit (Life Technologies), 5 µl of cDNA were submitted to qPCR reaction. Quantitative RT-PCR was performed with TaqMan[®] Fast Real Time PCR System, according to the manufacturer's recommendations (Applied Biosystems). Primer pairs used are listed in (Supplementary Table (S1)). *Gapdh* gene served as an endogenous control for evaluation of all mRNA levels. For each experiment, different cDNA samples were analyzed in duplicate. Relative gene expression values were determined using the comparative $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method after normalization to *Gapdh* gene [31].

2.5. Fluidigm Assay

After pre-amplification PCR, qPCR was performed using the high-throughput platform BioMark[™] HD System and the 96.96 GE Dynamic Arrays (Fluidigm Corporation, CA, USA) in triplicates in assays following the manufacturer's protocol [32]. The data were analyzed with Real-Time PCR Analysis Software in the BioMark instrument. Ct values were processed by automatic threshold for all assays, with derivative baseline correction using BioMark Real-Time PCR Analysis Software 4.1.3 (Fluidigm).

2.6. Cochlea Whole-Mount Surface Preparations

The cochlear epithelium preparations were collected from newborn Swiss wild-type mice (P1). After decapitation, the temporal bones containing the inner ears were removed from the skull, the cochleae were opened and the cochlear epithelium was separated from the modiolus by microdissection.

2.7. Immunocytochemistry and Microscopy

In vitro differentiated cells and cochlear whole mount-preparations were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 15 min at room temperature.

Unspecific binding was blocked in 0.3% Triton X-100, 10% normal donkey serum and 1% bovine serum albumin in PBS for 30 min. Then, samples were incubated overnight at 4°C with specific primary antibodies (Supplementary Table (S2)) diluted in the same buffer without Triton X-100. Afterwards, they were washed and incubated with the corresponding AlexaFluor (Molecular Probes) secondary antibodies and the nuclei were counterstained with Hoechst. Control experiments including negative control (i.e. without primary antibodies) were processed in parallel. Samples were mounted using Prolong Gold Antifading reagent on Superfrost glass slides (Life Technologies). The images were acquired with a Zeiss confocal microscope LSM 710 NLO Zeiss and Zen software (Zeiss, Jena, Germany).

2.8. Cell Counting and Statistical Analysis

The cells were counted manually using Graphic tools of Zeiss computer software (Zen 2012, blue edition). The fraction of immunopositive-cells among the total number of cells identified by Hoechst was used to label all nuclei in at least five fields per coverslip in each *in vitro* condition. Three independent experiments were conducted for each determination and data were expressed as mean \pm sem. Graph Pad Prism software was used for statistical analysis. All results are presented as the mean \pm sem (standard error of the mean) of the independent experiments. Data were analyzed using the Student's t-test or one-way ANOVA. Differences between means were tested by Mann-Whitney test. Statistical difference was reported for p-values below 0.05, an asterisk indicates significant differences between means (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001).

3. Results

3.1. Efficient Differentiation of hiPSC-derived Otic/Placodal Progenitors

With the aim to study the differentiation of hiPSCs into a late otic sensory cell lineage, we used a fully characterized hiPSCs line expressing the hallmarks of pluripotency markers as confirmed by immunolabelling for NANOG, OCT3/4, SSEA4 and SOX2 (Supplementary Figure (S1)). In our differentiation experiments, we used a guided stepwise strategy with hiPSCs growing as adherent monolayers (Figure 1(a)). First, in an attempt to derive early otic/placodal progenitors from hiPSCs, we tested whether enriching DFNB culture medium with FGF3/FGF10 was sufficient to trigger their induction into early otic lineage, as this was previously reported with hESCs [16]. First, we observed that hiPSCs underwent a rapid and profound morphological changes upon FGF3/FGF10 treatment suggesting their differentiation (Figures 1(b), 2(a)). To determine whether the cells start differentiating toward the early otic lineage, we assessed the dynamic expression of a panel of lineage markers known to be expressed during the otic placode developmental stage. We focused on the changes in the expression of transcription factors belonging to the *pax*, *dlx* and *gata* gene families, among which some are key markers known to define otic placode identity [33, 34]. More specifically, we used a combined expression of *PAX2*, *PAX8*, *GATA3* and *DLX5* gene markers to track the differentiation of hiPSCs toward early placodal otic cell lineage. Analysis of transcript relative expression of these genes showed that differentiated cells from hiPSCs start expressing these markers by day-6 *in vitro* (Figure (2b)). Confirming these first observations, immunocytochemistry analyses revealed that *PAX2*, *GATA3*, *DLX5* and *PAX8* were also expressed at the protein level in a subset of the differentiated cells (Figure 2(c)). Interestingly, some of these differentiated cells displayed double immunolabeling for *DLX5* and *GATA3* markers (Figure. 2(d)). As early as day-6 *in vitro*, quantitative analysis revealed that *PAX2*, *GATA3*, *DLX5* and *PAX8* were respectively expressed by $13.68\% \pm 2.44\%$, $10.32\% \pm 1.57\%$, 23.03 ± 4.28 and $6.89\% \pm 4.28\%$ of differentiated cells (Figure 2(c)). These results suggested that a subset of differentiating cells was rapidly engaged toward the otic/placodal lineage during the time course of our *in vitro* induction procedure. We then checked whether extending the exposure time to FGF3/FGF10 could contribute to improving the outcome of otic differentiation (Figures 3(a)–3(c)).

PCR fluidigm analyses of a panel of otic placode stage markers indicated that *PAX2*, *GATA3* and *DLX5* transcripts significantly increased after 13 days of differentiation, with *PAX2* and

GATA3 being expressed at a greater level when compared to day-6 of differentiation (Figure 3(a)). On the contrary, we observed that *PAX8* expression was lost, confirming a transient and early expression of *PAX8* during otic differentiation. To confirm our results, we next quantified *PAX2*⁺ cells at this time point of differentiation. Interestingly, the temporal analysis of *PAX2*⁺ cells showed a significant and progressive increase of *PAX2*⁺ cells levels from (12.68% ± 2.12%, ** p = 004) at day-6 up to (29.34% ± 3.51%, *** p= 0009) at day-13 of our *in vitro* differentiation (Figure 3(c)). Of importance, this paired box transcription factor, *PAX2* has been deemed as one of a crucial otic/placodal lineage markers [35, 36].

Together, our results demonstrate that FGF3/FGF10 treatment is sufficient to induce the differentiation of a subset of hiPSCs toward the otic/placodal lineage as early as day-6 *in vitro*, and that an extended subsequent exposure to the same inducing agents contribute to a significant increase in the number of otic progenitor-like cells by day-13 *in vitro*.

3.2. Notch Inhibition Enhances Differentiation into Otic sensory Marker-Expressing Cells

Next, we asked whether newly generated hiPSC-derived otic/placodal progenitors could be further differentiated into late otic cells able to generate initial HC-like phenotype. To this end, cells at day-13 of differentiation were switched to a culture medium containing RA and EGF, modulators of two signaling pathways that are active during inner ear development. RA has pleiotropic functions during embryogenesis and is also known to expand otic competence within posterior placode during inner ear development [37, 38], whereas EGF participates in regulating the *in vitro* production of HCs in embryonic and early postnatal inner ears [39,40]. Of interest, it has been shown that synergistic interaction between RA and EGF can induce differentiation of HC-like cells differentiation from hESCs [16].

In this study, after 7 days of differentiation under a combined RA/EGF treatment (Figure 4(a)), qPCR assays were performed to examine a possible progression of otic/placodal progenitors-derived hiPSCs into late otic marker-expressing cells. Analysis of transcript expression data revealed a significant downregulation of most early placodal/otic markers after 7 days of RA/EGF exposure, suggesting a possible cell fate transition and further commitment of the hiPSC-derived otic progenitors (Figure 4(c)). Strikingly, *PAX2* relative gene expression returned to a basal expression level. Interestingly, this loss of placodal/otic progenitor identity as revealed by the decrease *pax2* relative gene expression level (47.67 ± 7.41) at day-13 vs (3.79 ± 1.87) at day-20 (Figure 4(c)) was accompanied by a significant upregulation of some

late otic markers, such as *ATOH1* (Figure 4(d)). Paralleling this observation, the significant downregulation of pluripotency marker transcript levels confirmed that during *in vitro* differentiation most cells had lost their pluripotency features by day-20 (Figure 4(b)).

The overall results of these gene expression analyses revealed that in parallel to the loss of early otic placode markers upon RA/EGF treatment, hiPSC-derived otic progenitor-like cells start expressing a subset of late otic gene markers. In order to assess whether other treatments could ameliorate the specification of otic progenitor-like cells into a late otic phenotype, we decided to evaluate the impact of Notch inhibition in our hiPSC-derived cell cultures. Indeed, data from our laboratory and others have demonstrated a crucial role of Notch signaling in otic development and cell-fate decisions [19–24]. Accordingly, we next examined whether a disruption of Notch pathway could differentially affect the late otic sensory lineage from hiPSC-derived otic/placodal progenitors as compared to RA/EGF treatment.

To evaluate the impact of Notch inhibition on otic cell differentiation *in vitro*, hiPSC-derived otic progenitor cells from day-13 were subjected to a treatment with gamma-secretase inhibitor (DBZ compound, 5 μ M) over a one-week period (Figure 5(a)). At the end point of DBZ treatment (i.e. day-20), differentiated cells were harvested to analyse the expression levels for a panel of late otic gene markers and their relative expression levels were respectively compared between the DBZ and RA/EGF-treated age matched cultures (Figure 5). Similarly to what we observed upon RA/EGF treatment, qPCR analyses on DBZ-treated cells showed the downregulation of otic/placodal markers. Remarkably, *PAX2* downregulation was significantly higher in DBZ-treated cultures compared to RA/EGF-treated-cell cultures (Figure 5(b)).

To examine the role of Notch signaling in late otic differentiation, we then evaluated the relative gene expression levels of major downstream effectors of Notch pathway involved in cell fate processes in the developing inner ear [41–43]. Our qPCR analyses revealed that DBZ treatment leads to a significant downregulation of *HES5* and *LFNG* that are two crucial components of Notch signaling pathway (Figure 5(c)). This decrease in *HES5* and *LFNG* transcripts was accompanied with a significant increase in the relative expression of the late otic marker (i.e. *ATOH1*) in DBZ compared to RA/EGF-treated cultures, suggesting a greater effect of Notch inhibition on late otic commitment. In addition, we observed that the *MYO7A*-encoding gene was also significantly upregulated in DBZ-treated cultures (Figure 5(d)). *MYO7A* being one of the specific initial HC proteins, we next checked whether *MYO7A* protein expression could be detected in the DBZ-treated cells. Immunolabelling against *MYO7A* confirmed that *MYO7A*

could be detected in DBZ-treated cultures. Strikingly, we observed that about (50.15% \pm 9.75%, * $p = 0.04$) of differentiated cells were immunopositive for MYO7A in DBZ-treated cells, in contrast to (4.83% \pm 0.96%) in RA/EGF-treated cells (Figure 5(e)). Furthermore, co-immunostaining analysis revealed that MYO7A⁺ cells co-expressed another important late otic sensory marker i.e., POU4F3 (Figure 6(b)). Of importance, the specificity of the MYO7A and POU4F3 immunophenotype was corroborated by their expression in whole-mount preparations of postnatal day-1 mouse cochlea (Figures 6(d)–6(f)). As in the *in vivo* tissue, we found the same expression pattern, with POU4F3 confined to the nucleus and MYO7A located in the cytoplasm. Noticeably, the expression pattern of MYO7A in our differentiated cells was mainly confined in a perinuclear cap-like structure that may indicate a polarization of the generated cells (Figure 6(c)) matching with a HC-like phenotype, but also probably reflect their immaturity when compared to their *in vivo* counterparts with a broader distribution within the entire cytoplasm. Altogether our data suggest that Notch inhibition promotes the differentiation of late otic and initial HC markers-expressing cells from hiPSCs-derived placodal/otic progenitors in the treated monolayer cell cultures.

4. Discussion

Regenerative medicine offers reasonable expectations for the potential treatment of inner ear disorders through the replacement of lost or damaged sensory cells. Initial advances in the differentiation of murine ESCs/iPSCs into HCs and neuron-like cells [9–14] have paved the way for similar progresses with pluripotent stem cells from human origin. Compelling evidences accumulated over the last decade support that the hiPSC technology will offer multiple perspectives for stem cell biology research, disease modeling approaches and cell-based therapies in many different types of tissues. In the case of the inner ear, one of the challenges is to better define the developmental signaling pathways and their sequential activation/inactivation for the efficient *in vitro* production of human inner ear placodal/otic progenitors and their further efficient differentiation into late otic sensory cell-like cells. In this study our aim was to promote the human placodal/otic induction process and the generation of late otic sensory lineage cells by exploring and comparing the effects of timely modulations of major signaling pathways during hiPSCs differentiated *in vitro*. Our results showed that the expression of otic/placodal lineage markers can be induced through the activation of the FGF signaling pathway by FGF3 and FGF10 ligands, suggesting that human placodal development and otic induction from hiPSCs is also an FGF-dependent process, as previously demonstrated

with lineage guidance of mESCs [9-14] and hESCs [16, 44]. In addition to PAX2 expression during the time course of *in vitro* induction, one of the critical otic/placodal lineage markers, our results showed a population of hiPSC-derived otic/placodal progenitors that co-expressed other markers such as, DLX5, GATA3 and PAX8, which are generally found in the native otic placode. Although not specific individually, the combined expression of multiple otic/placodal gene markers has been previously appreciated as a good indicator for otic lineage identity [16, 34, 44]. Thus, our results suggest that FGF-treated hiPSCs lead to the generation of a subset of cells that resemble human otic progenitor cells. After this induction phase, we tested appropriate *in vitro* conditions that could enhance the ability of otic progenitors to further differentiate into cells-expressing late otic sensory lineage markers. To this end, the differentiation potential of these otic progenitors-derived hiPSCs has been tested under Notch inhibition (i.e. DBZ-treated) as compared to another culture condition using RA/EGF treatment previously defined to promote HCs *in vitro* from hESCs [16].

In the current study, we used the most ultimate markers (ATOH1, POU4F3 and MYO7A) of differentiating HCs to examine for a possible sensory cell identity after challenging human otic progenitors with either DBZ compound or RA/EGF supplements for an additional 8 days in culture. The late otic sensory lineage specification depends on the proneural gene *atoh1* and its interactions with other transcription factors [45]. *Atoh1*, is necessary and in some contexts sufficient for early inner ear HC development [46]. The *pou4f3* and *myo7a* genes are expressed in differentiating HCs during their early development [47,48] shortly after *atoh1* expression and considered to be initial HC markers in otic lineage studies [25, 46].

Of interest, our qPCR analysis revealed a significant up regulation of *atoh1* expression when early otic progenitor cells were exposed to RA/EGF. This observation fits with the roles of EGF and retinoid signaling in inner ear development and with a previous report from a hESC study [16]. It has been also demonstrated that the RA signaling regulates otic vesicle formation *in vivo* [37], whereas EGF receptor ligands i.e., EGF/TGF β promote proliferation and/or maintenance of inner ear progenitor cells under defined *in vitro* conditions [39, 40]. In contrast, for otic progenitors maintained 8 days *in vitro* under Notch inhibition, we observed a significant increase in the relative expression of both *atoh1* and *myo7a* genes as compared to their levels in age-matched RA/EGF-treated cultures. In addition to the magnitude of the fold changes of these markers, challenging early otic progenitors with DBZ compound resulted in generating (~50% of total) of differentiated cells-immunopositive for MYO7A when compared to RA/EGF-treated cultures (~5% of total).

Our immunostaining results provide additional insight and support the efficient promotion of otic sensory lineage achieved under Notch modulation, which leads also to differentiate cell populations that were double immunopositive for MYO7A and POU4F3. Interestingly, using an embryoid body model Costa et al. [13], generated HC-like cells (i.e., MYO7A immuno+ cells) using mouse ESCs by genetic programming through combined overexpression of *atoh1*, *gfi1* and *pou4f3* transcription factors.

In DBZ *in vitro* condition, we observed a concomitant decrease in a relative expression of *hes5* a bHLH gene and *lnfg* a Fringe gene which are both components of Notch signaling when compared to the results from the RA/EGF-treated cultures. This result was in accordance with our previous finding that a pharmacological inhibition of Notch signaling in mouse inner ear tissue specific-stem cells differentiated in a sphere model led to a significant downregulation of *Hes5* [49]. Furthermore, a recent study demonstrated that initial pro-sensory cell fate is regulated by Fringe activity, required low levels of Notch signaling and was sensitive to changes in signaling in the mouse developing cochlea [24]. Another subsequent cell fate decision operates in a lateral inhibition mechanism to sort out supporting cells and HCs during organ of Corti development [19, 22, 23]. This second cell fate process was reported to not require Fringe activity and was much less sensitive to small changes in Notch signaling activity [24]. Taken into account the increase in the expression of late otic sensory markers and downregulation of *hes5* and *lnfg* known to modify Notch signal transduction properties [50], it would be consistent that in our *in vitro* differentiation system, a pharmacological reduction of Notch activity for a week could likely affect the otic sensory cell fate which depends on Fringe proteins regulation in combination with Notch downstream mediators, i.e. *Hes* expression. These results revealed that human otic progenitors derived from hiPSCs were capable of differentiation into cells-expressing markers for otic sensory lineage, which was enhanced by pharmacological modulation of Notch pathway as compared to cells exposed to RA/EGF. Although, human otic progenitors differentiated either under EGF/RA or DBZ compound displayed expression of HC-initial-specific markers Myo7A and Pou4F3, their expression was not sufficient to promote the formation of hair bundle-like structures as was reported in differentiated murine pluripotent stem cells [10, 12, 13]. However, the lack of hair bundle-like structures suggested that human otic sensory cells generated after Notch modulation were at a nascent state of commitment to HC phenotype and fail to continue final maturation in the conditions provided by our hiPSC culture system. Additional *in vitro* studies are warranted in order to check whether simultaneous inhibition of Notch and activation of RA/EGF or other

signaling pathways may provide proper instructive cues for late otic cells to fully mature and generate human HC-like cells harboring functional hair bundles.

In conclusion, our findings provide a useful human induced pluripotent stem cell differentiation assay to generate large numbers of otic/placodal progenitors with a propensity to give rise to late stage otic cells (Figure 7). A distinguishing feature of this oriented differentiation by using this monolayer culture system is the capacity to fairly reflect the *in vivo* situation as to the development of the inner ear otic sensory lineage. This study could provide a foundation to reach a better comprehension of the molecular mechanisms controlling human otic differentiation and a useful step toward future explorations of the transplantation potential of characterized human otic progenitor cells.

Conflict of Interests

The authors indicate no potential conflict of interests

Acknowledgements

We thank Professors B. Fritsch (University of Iowa) and T. Van De Water (University of Miami) for their critical reading. We thank Dr. M. Khrestchatisky and Prof. François Féron (NICN, AMU, France) for lab facility. The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme under grant agreement No. 603029 (Project OTOSTEM).

References

- [1] C. Agrup, M. Gleeson, and P. Rudge, "The inner ear and the neurologist," *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, vol. 78, no. 2, pp. 114–122, 2007.
- [2] J. M. Appler and L. V. Goodrich, "Connecting the ear to the brain: molecular mechanisms of auditory circuit assembly," *Prog Neurobiol*, vol. 93, no. 4, pp. 488–508, 2011.
- [3] M. W. Kelley, "Regulation of cell fate in the sensory epithelia of the inner ear," *Nat Rev Neurosci*, vol. 7 no. 11, pp. 837–49, 2006.
- [4] I. Jahan I, N. Pan, K. L. Elliott, and B. Fritsch, "The quest for restoring hearing: Understanding ear development more completely," *Bioessays*, 37:1016–1027. 2015.
- [5] J. Corwin and D. Cotanche, "Regeneration of sensory hair cells after acoustic trauma," *Science*, vol. 240, no. 4860, pp. 1772–1774, 1988.
- [6] B. M. Ryals and E. W. Rubel, "Hair cell regeneration after acoustic trauma in adult Coturnix quail," *Science*, vol. 240, no. 4860, pp. 1774 –1776, 1998.
- [7] J. V. Brigande and S. Heller, "Quo vadis, hair cell regeneration?," *Nat Neurosci*, vol. 12 no. 6, pp. 679–685, 2009.
- [8] A. Zine, H. Lowenheim, and B. Fritsch, "Toward translating molecular ear development to generate hair cells from stem cells," *Springer*, pp. 111–161, 2014.
- [9] H. Li, G., Roblin, H. Liu et al., "Generation of hair cells by stepwise differentiation of embryonic stem cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 23, pp. 13495–13500, 2003.
- [10] K. Oshima, K. Shin, M. Diensthuber et al., "Mechanosensitive hair cell-like cells from embryonic and induced pluripotent stem cells," *Cell*, vol. 141, no. 4, pp. 704–716, 2010.

- [11] Y. Ouji, S. Ishizaka, F. Nakamura-Uchiyama et al., "In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells into inner ear hair cell-like cells using stromal cell conditioned medium," *Cell Death Dis*, vol. 3, e314, 2012.
- [12] K. R. Koehler, A. M. Mikosz, A. I. Molosh et al., "Generation of inner ear sensory epithelia from pluripotent stem cells in 3D culture," *Nature*, vol. 500, no. 7461, pp. 217–221, 2013.
- [13] A. Costa, L. Sanchez-Guardado, S. Juniat et al., "Generation of sensory hair cells by genetic programming with a combination of transcription factors," *Development*, vol. 142, no. 11, pp. 1948–1959, 2015.
- [14] N. Abboud, A. Fontbonne, I. Watabe, A. Tonetto, J. M. Brezun, F. Feron, and A. Zine, "Culture conditions impact the maturation of traceable, transplantable mouse embryonic stem cell-derived otic progenitor cells," *J Tissue Eng Regen Med*, vol. 11, no. pp. 1132–1140, 2016.
- [15] F. Shi, C. E. Corrales, M. C. Liberman, and A. S. Edge, "BMP4 induction of sensory neurons from human embryonic stem cells and reinnervation of sensory epithelium," *Eur J Neurosci*, vol. 26, no. 11, pp. 3016–3023, 2007.
- [16] W. Chen, N. Jongkamonwiwat, L. Abbas, S. J. Eshtan, S. L. Johnson, S. Kuhn, M. J. K. Milo, Thurlow, P. W. Andrews, W. Marcotti, H. G. Moore, and M. N. Rivolta, "Restoration of auditory evoked responses by human ES-cell-derived otic progenitors," *Nature*, vol. 490, no. 7419, pp. 278–282, 2012.
- [17] J. A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S. S Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, and J. M. Jones, "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts," *Science*, 282:1145–1147, 1998.
- [18] K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, and S. Yamanaka, "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors," *Cell*, vol. 131, no. 5, pp. 861–872, 2007.
- [19] A. Zine, T. R. Van De Water and, F. de Ribaupierre, "Notch signaling regulates the pattern of auditory hair cell differentiation in mammals," *Development*, 127:3373–3383, 2000.

- [20] A. Zine, "Molecular mechanisms that regulate auditory hair-cell differentiation in the mammalian cochlea," *Mol Neurobiol*, 27:223–238, 2003.
- [21] C. S. Jayasena, T. Ohyama, N. Segil, and A. K. Groves, "Notch signaling augments the canonical Wnt pathway to specify the size of the otic placode," *Development*, 135:2251–2261, 2008.
- [22] A. E. Kiernan, "Notch signaling during cell fate determination in the inner ear," *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 24:470–479, 2013.
- [23] N. Daudet, L. Ariza-McNaughton and, J. Lewis, "Notch signalling is needed to maintain, but not to initiate, the formation of prosensory patches in the chick inner ear," *Development*, 134:2369–2378, 2007.
- [24] M. L. Basch, R. M. Brown, H. I. Jen, F. Semerci, F. Depreux, R. K. Edlund, H. Zhang, C. R. Norton, T. Gridley, S. E. Cole, A. Doetslhofer, M. M. Savatic, N. Segil, and A. K Groves, "Fine-tuning of Notch signaling sets the boundary of the organ of Corti and establishes sensory cell fates," *eLife*, vol. 14. no. 5, e19921, 2016.
- [25] S. J. Jeon, L. Fujioka, S. C. Kim, and A. S. Edge, "Notch signaling alters sensory or neuronal cell fate specification of inner ear stem cells," *J Neurosci*, vol. 31, no. 23, pp.8351–835, 2011.
- [26] K. Mizutari, M. Fujioka, M. Hosoya, N. Bramhall, H. J. Okano, H. Okano, and A. S. Edge, "Notch inhibition induces cochlear hair cell regeneration and recovery of hearing after acoustic trauma," *Neuron*, 77:58–69, 2013.
- [27] S. Artavanis-Tsakonas, M. D. Rand, and R. J. Lake, "Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development," *Science*, vol. 284, no. 5415, pp. 770–776, 1999.
- [28] U. Koch, R. Lehal, and F. Radtke, "Stem cells living with a Notch," *Development*, vol. 140, no. 4, pp. 689–704, 2013.

- [29] A. M. Rossi and C. Desplan, "Asymmetric Notch amplification to secure stem cell identity," *Dev Cell*, vol. 40, no. 6, pp. 513–514, 2017.
- [30] M. Ulvestad, P. Nordell, A. Asplund, M. Rehnström, S. Jacobsson, G. Holmgren, et al, "Drug metabolizing enzyme and transporter protein profiles of hepatocytes derived from human embryonic and induced pluripotent stem cells," *Biochem Pharmacol*, vol. 86, no. 5, pp. 691–702, 2013.
- [31] K. J. Livak, T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001.
- [32] S. L. Spurgeon, R. C. Jones, and R. Ramakrishnan, "High throughput gene expression measurement with real time PCR in a microfluidic dynamic array," *PLoS One*, vol. 3, no. 2, pp. e1662, 2008.
- [33] M. D. Bouchard, D. de Caprona Busslinger, M. Busslinger, P. Xu, and B. Fritzsche, "Pax2 and Pax8 cooperate in mouse inner ear morphogenesis and innervation," *BMC Dev Biol*, 20;10:89, 2010.
- [34] M. Ealy, D. C. Ellwange, N. Kosaric, A. P. Stapper, and S. Heller, "Single-cell analysis delineates a trajectory toward the human early otic lineage," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 113, no. 30, pp. 8508-8513, 2016.
- [35] Q. Burton, L. K. Cole, M. Mulheisen, W. Chang, and D. K. Wu, "The role of Pax2 in mouse inner ear development," *Dev Biol*, vol. 272, no. 1, pp. 272,161–175, 2004.
- [36] N. A. Christophorou, M. Mende, L. Lleras-Forero et al., "Pax2 coordinates epithelial morphogenesis and cell fate in the inner ear," *Dev Biol*, vol. 345, no. 2, pp. 180–190, 2010.
- [37] R. Romand, P. Dollé, and E. Hashino, "Retinoid signaling in inner ear development," *J Neurobiol*, vol. 66, no. 7, 687–704, 2005.

- [38] S. Hans and M. Westerfield, "Changes in retinoic acid signaling alter otic patterning," *Development*, vol. 134, no.13, pp. 2449–2458, 2007.
- [39] A. Zine and F. de Ribaupierre, "Replacement of mammalian auditory hair cells," *NeuroReport*, vol. 9, no. 2, pp. 263–268, 1998.
- [40] A. Doetzlhofer, P. M. White, J. E. Johnson, N. Segil, and A. K. Groves, "*In vitro* growth and differentiation of mammalian sensory hair cell progenitors: a requirement for EGF and periotic mesenchyme," *Dev Biol*, vol. 272, no. 2, pp. 432–447, 2004
- [41] A. Zine, A. Aubert, J. Qiu, S. Therianos, F. Guillemot, R. Kageyama, and F. de Ribaupierre, "Hes1 and Hes5 activities are required for the normal development of the hair cells in the mammalian inner ear," *J Neurosci*, vol. 21, no. 13, pp. 4712–4720, 2001.
- [42] T. Tateya I. Imayoshi, I. Tateya, J. Ito, and R. Kageyama, "Cooperative functions of Hes/Hey genes in auditory hair cell and supporting cell development," *Dev Biol*, vol. 352, no. 2, 329–340, 2011.
- [43] Y. Abdolazimi, Z. Stojanova and N. Segil, "Selection of cell fate in the organ of Corti involves the integration of Hes/Hey signaling at the Atoh1 promoter," *Development*, vol. 143, no. 5, pp. 5841–5850, 2016.
- [44] M. Ronaghi , M. Nasr, M. Ealy, R. Durruthy-Durruthy, J. Waldhaus, G. H. Diaz, L. M. Joubert, K. Oshima, and S. Heller, "Inner ear hair cell-like cells from human embryonic stem cells," *Stem Cells Dev*, 23:1275–1284, 2014.
- [45] J. Mulvaney and A. Dabdoub, "Atoh1, an essential transcription factor in neurogenesis and intestinal and inner ear development: function, regulation, and context dependency," *J Assoc Res Otolaryngol*, vol. 13, no. 3, pp. 281–293, 2012.
- [46] C. Woods, M. Montcouquiol and M. K. Kelley, "Math1 regulates development of the sensory epithelium in the mammalian cochlea," *Nat Neurosci*, vol. 7, no. 12, 1310–1318, 2004.

- [47] I. Sahly, A. El-Amraoui, M. Abitbol et al., "Expression of myosin VIIA during mouse embryogenesis," *Anat Embryol*, vol. 196, no. 2, pp. 159–170, 1997.
- [48] M. Xiang, L. Gan, D. Li et al., "Essential role of POU-domain factor Brn-3c in auditory and vestibular hair cell development," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 17, pp. 9445–9450, 1997.
- [49] E. Savary, J. C. Sabourin, J. Santo, J. P. Hugnot, C. Chabbert, T. Van De Water, A. Uziel and A. Zine, "Cochlear stem/progenitor cells from a postnatal cochlea respond to Jagged1 and demonstrate that notch signaling promotes sphere formation and sensory potential," *Mech Dev*, 125:674–686, 2008.
- [50] R. A. Rana and R. S. Haltiwanger, "Fringe benefits: functional and structural impacts of O-glycosylation on the extracellular domain of Notch receptors," *Current Opinion in Structural Biology*, 21:583–589, 2011.

Figure Legends

FIGURE 1: Schematic summary outlining the monolayer culture otic differentiation from hiPSCs. (a) In the first step (step1), hiPSCs at day-0 were exposed to FGF3 and FGF10 growth factors until day-13 for early otic/placodal induction and, in the second step (step2) differentiated into late otic cells by exposure to either RA/EGF or DBZ until day-20.

(b, c) Morphology characteristics of hiPSCs-derived otic progenitor cells after FGF3/10, RA/EGF and DBZ treatments respectively. Scale bar = 200 μm . Abbreviations: DFNB, DMEM/F12 supplemented with N2 and B27; RA, Retinoic Acid; DBZ, difluorobenzeneacetamide; EGF, Epithelial Growth Factor; FGF, Fibroblast Growth Factor.

FIGURE 2: Development of otic/placodal competence and expression of early lineage markers in adherent monolayer cultures at day-6 *in vitro*. (a) A bright-field view of hiPSCs-derived otic/placodal progenitors after FGF3/10 exposure. An example of a colony displaying cells with spindle-like shape, indicating conversion efficiency from undifferentiated

hiPSCs into early otic/placodal progenitors (insets). Scale bar = 200 μm . (b) A histogram depicting values that were expressed as fold change relative to hiPSCs using RT-qPCR. Data were normalized to control for the amount of RNA isolated from undifferentiated hiPSCs (day-0) and this level of mRNA expression was referred as 1. At this stage of FGF treatment, a highly efficient induction of otic/placodal (i.e. *pax2*, *pax8* and *dlx5*) gene markers, compared to hiPSC cultures. Statistical differences were determined with unpaired Student's t-test when comparing mRNA expression level between undifferentiated (day-0) and differentiated cells (day-6) cells. P values are indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ ($n = 3$). (c) Quantification of early otic lineage markers expression revealed by immunocytochemistry corroborated their significant upregulation (PAX2, GATA3 and DLX5) in FGF-treated cultures compared to their percentage in undifferentiated hiPSCs. (d) Representative immunostainings for PAX2, GATA3, PAX8 and DLX5 in day-6 otic/placodal cells. A population of PAX2+, PAX8+ (arrows), GATA3+ and DLX5+ cells are observed in these differentiated cultures. Interestingly, in some areas, cells co-expressed DLX5 and GATA3 (dotted circle). Nuclear Hoechst staining is shown in blue. Scale bars = 50 μm

FIGURE 3: Molecular characterization of otic progenitor cells. (a) Fluidigm qPCR of several otic/placodal gene markers expression in FGF3/10 differentiated cells after 13 days *in vitro*. A highly efficient expression of key-otic gene (i.e. *pax2*, *gata3* and *dlx5*) lineage markers while

pax8 expression is not determined at this stage of differentiation. Data were normalized to control for the amount of RNA isolated from undifferentiated hiPSCS and this level of mRNA expression was referred as 1. Statistical differences were determined with unpaired Student's t-test. P values are indicated with * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ (n = 3).

(b) PAX2 immunoreactivity in differentiated cells further confirms the otic placodal-like identity at day-13 *in vitro*. Nuclear Hoechst staining is shown in blue. Scale bar = 50 μm . (c) Cell quantification revealed a significant increase of PAX2 immuno (+) otic progenitor cells at day-13 when compared to their percentage in FGF-exposed cultures at day-6 *in vitro*. Statistical analyses used ANOVA multiple comparisons, different letters (a, b, c) indicate significant differences between groups (at least $p < 0.05$).

FIGURE 4: Differentiation of late otic cells. (a) Otic/placodal progenitors from day-13 were maintained for one more week (i.e. day-20) in medium supplemented with RA/EGF. (b) These differentiated progenitor cells exhibited a significant decrease in the expression of pluripotency factors. (c) They showed also a downregulation of a subset of otic placodal markers as determined by Fluidigm qPCR. (d) In contrast, in these RA/EGF cultures, we observed notable increase in some gene markers (*atoh1*, *pou4f3*, *myo7a*) that define the late otic cell fate and a significant upregulation of *atoh1* expression. Statistically significant differences are indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (n=3).

FIGURE 5: Enhancing human late otic sensory cells by Notch inhibition. (a) The otic/placodal progenitors from day-13 were exposed for 7 days (i.e. day-20) either to RA/EGF or DBZ compound. (b) Otic/placodal markers were significantly down-regulated in DBZ-treated when compared to RA/EGF-treated cells. (c) Down-regulation of a subset of Notch signaling genes (*hes5*, *hes7*, *lfng*) in DBZ-treated when compared to RA/EGF-treated cells. (d) The decrease of Notch pathway components after DBZ treatment was accompanied with a significant up-regulation of two late otic marker (*atoh1*, *myo7a*) transcripts. (e) Quantification of MYO7A+ cells in differentiated cells from DBZ-treated and RA/EGF treated- cultures revealed a large fraction of differentiated cells expressing MYO7A (50%) in DBZ treated when compared to RA/EGF-treated cells (4%). The individual bars visualize the fraction of positive immunolabelled cells to the total number of Hoechst-labeled cells. Shown are mean values and standard deviations determined in three independent experiments for each data set. Statistical differences were determined with unpaired Student's t-test. P values are indicated with * for P

< 0.05. (f) Representative immunostaining patterns for MYO7A in RA/EGF and DBZ-treated cultures at day-20. Scale bar = 20 μ m.

FIGURE 6: Expression pattern of late otic sensory markers *in vitro* mimics their earliest expression in the developing cochlear epithelium. After one week of treatment with DBZ, a subset of differentiated cells displayed co-expression MYO7A in the cytoplasm (shown in red) and POU4F3 in the nucleus (shown in green) as their expression patterns in *in vivo* mouse cochlear whole-mount preparations. Scale bars = 20 μ m.

FIGURE 7: Schematic representation of the generation of inner ear late otic sensory cells from hiPSCs by dual stepwise activation of FGF and inhibition of Notch signaling pathways in adherent monolayer cultures.

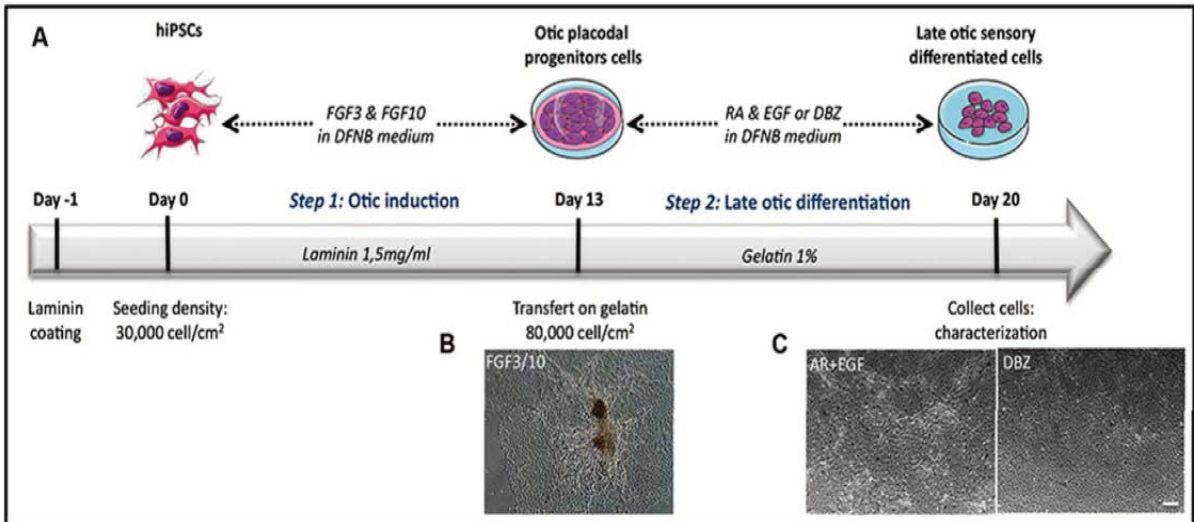


Figure 1 (Submitted in *Stem Cells and Development Journal*)

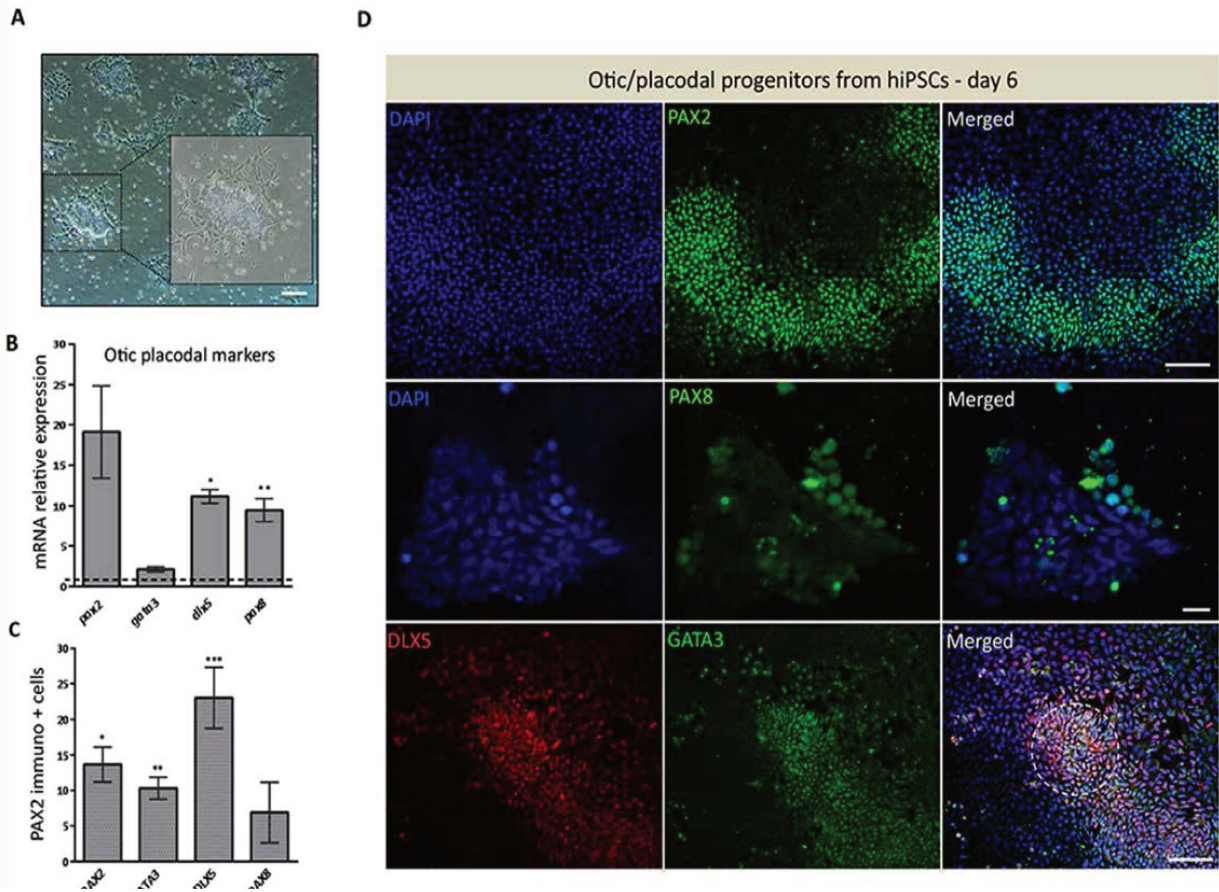


Figure 2 (Submitted in *Stem Cells and Development Journal*)

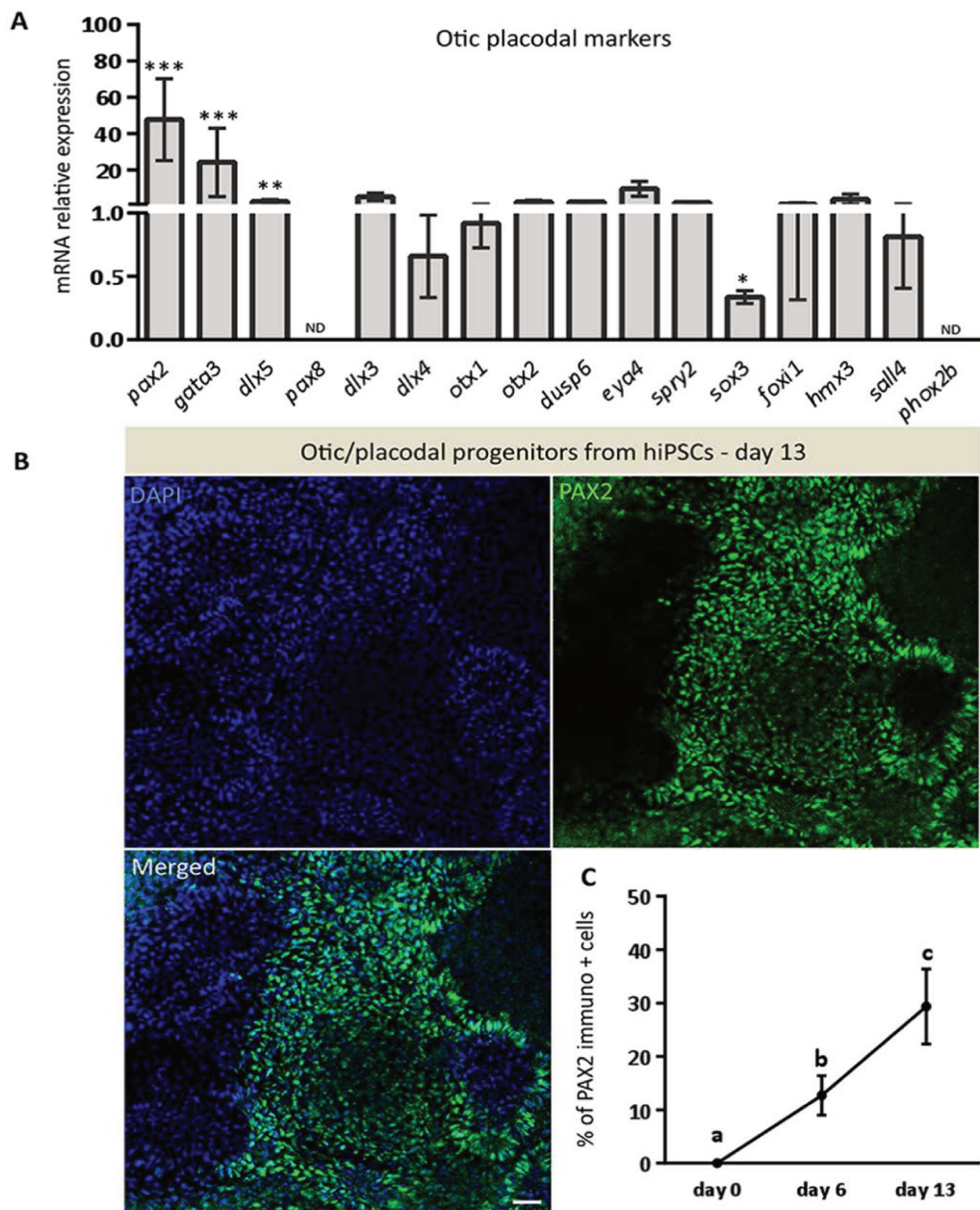


Figure 3 (Submitted in *Stem Cells and Development Journal*)

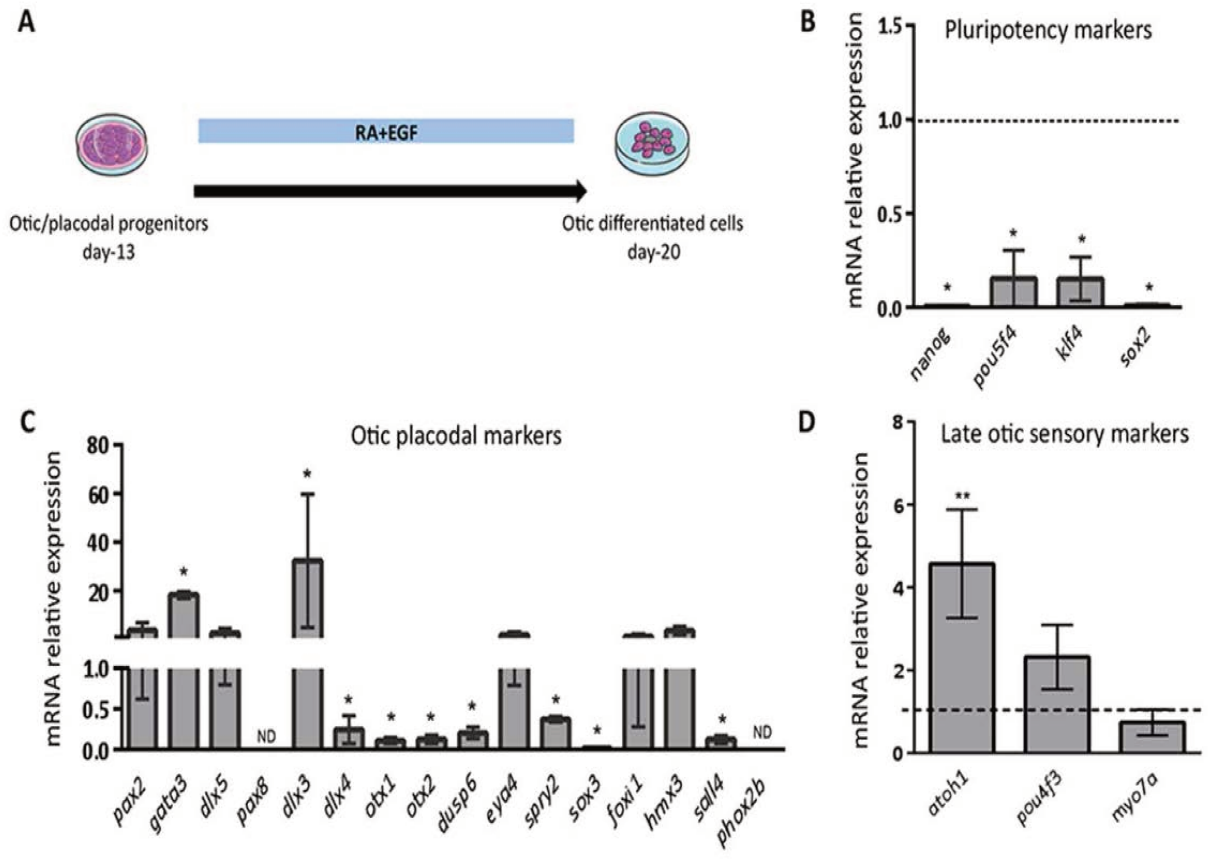


Figure 4 (Submitted in *Stem Cells and Development Journal*)

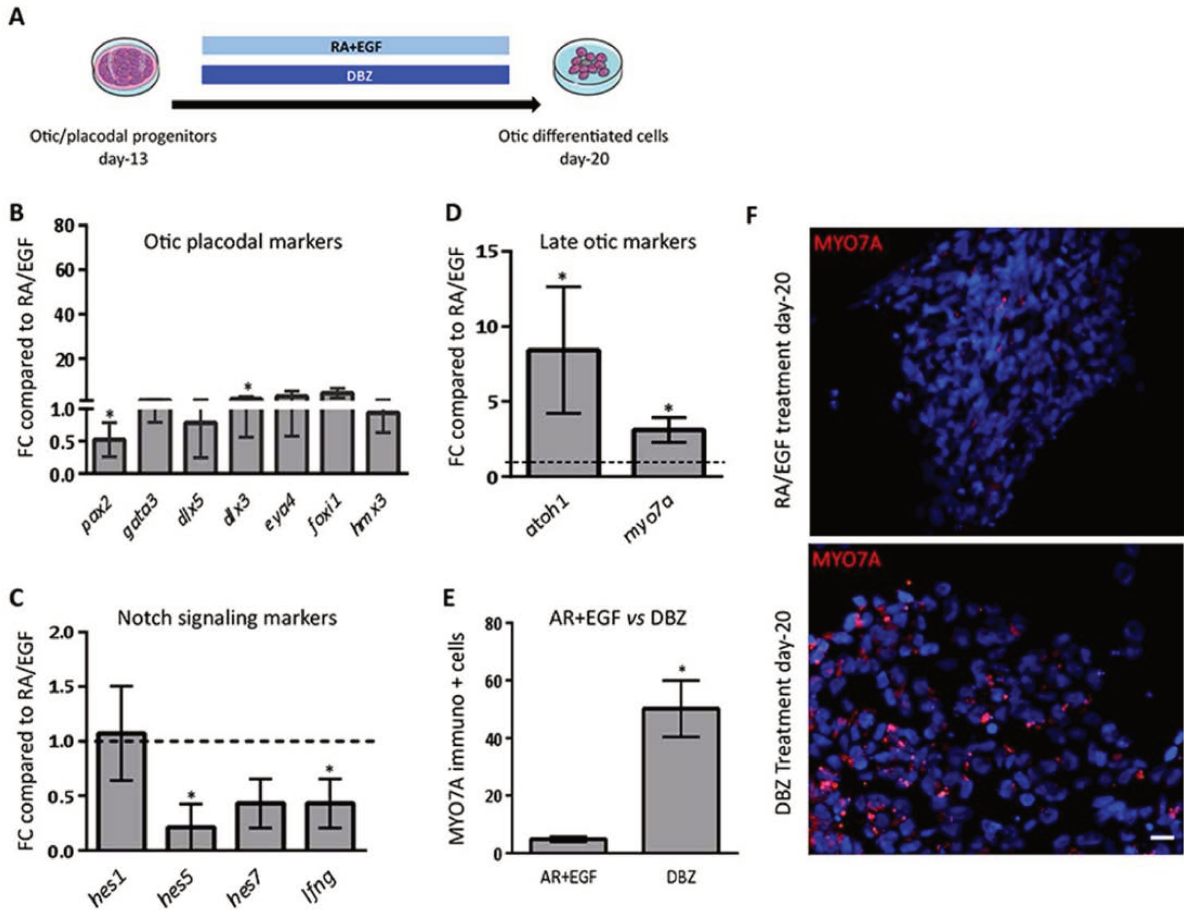


Figure 5 (Submitted in *Stem Cells and Development Journal*)

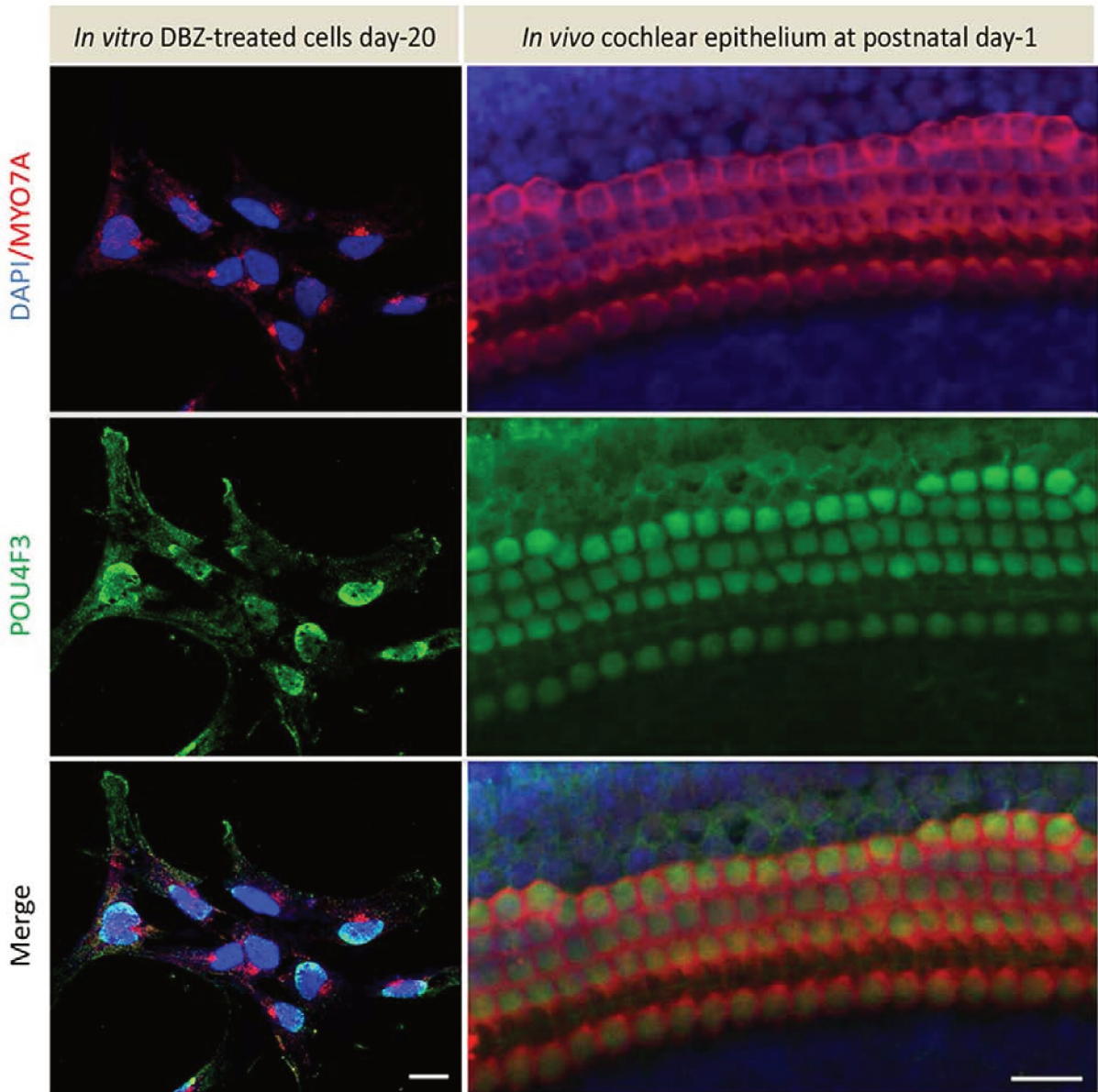


Figure 6 (Submitted in *Stem cells and Development Journal*)

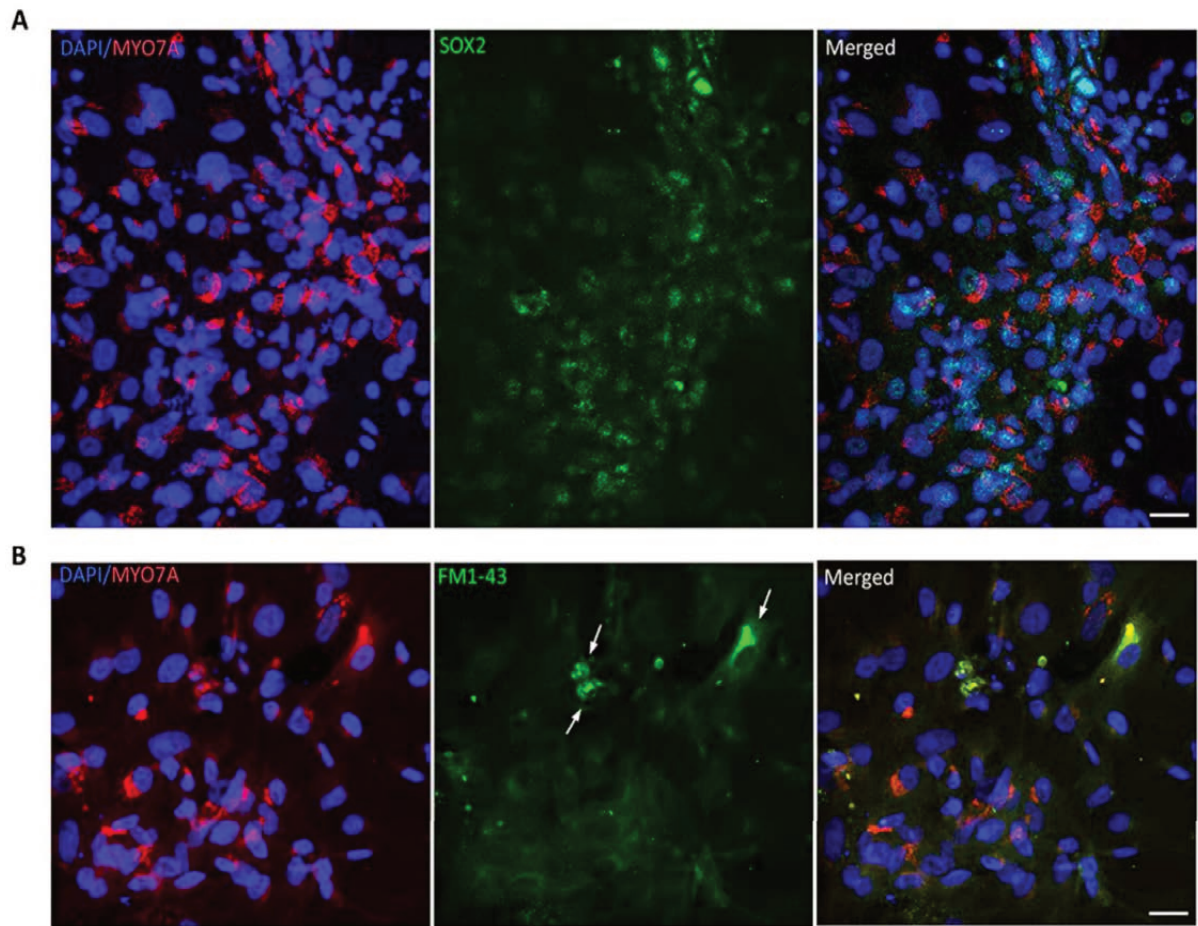


Figure 7 (*Submitted in Stem cells and development Journal*)

Supplementary informations

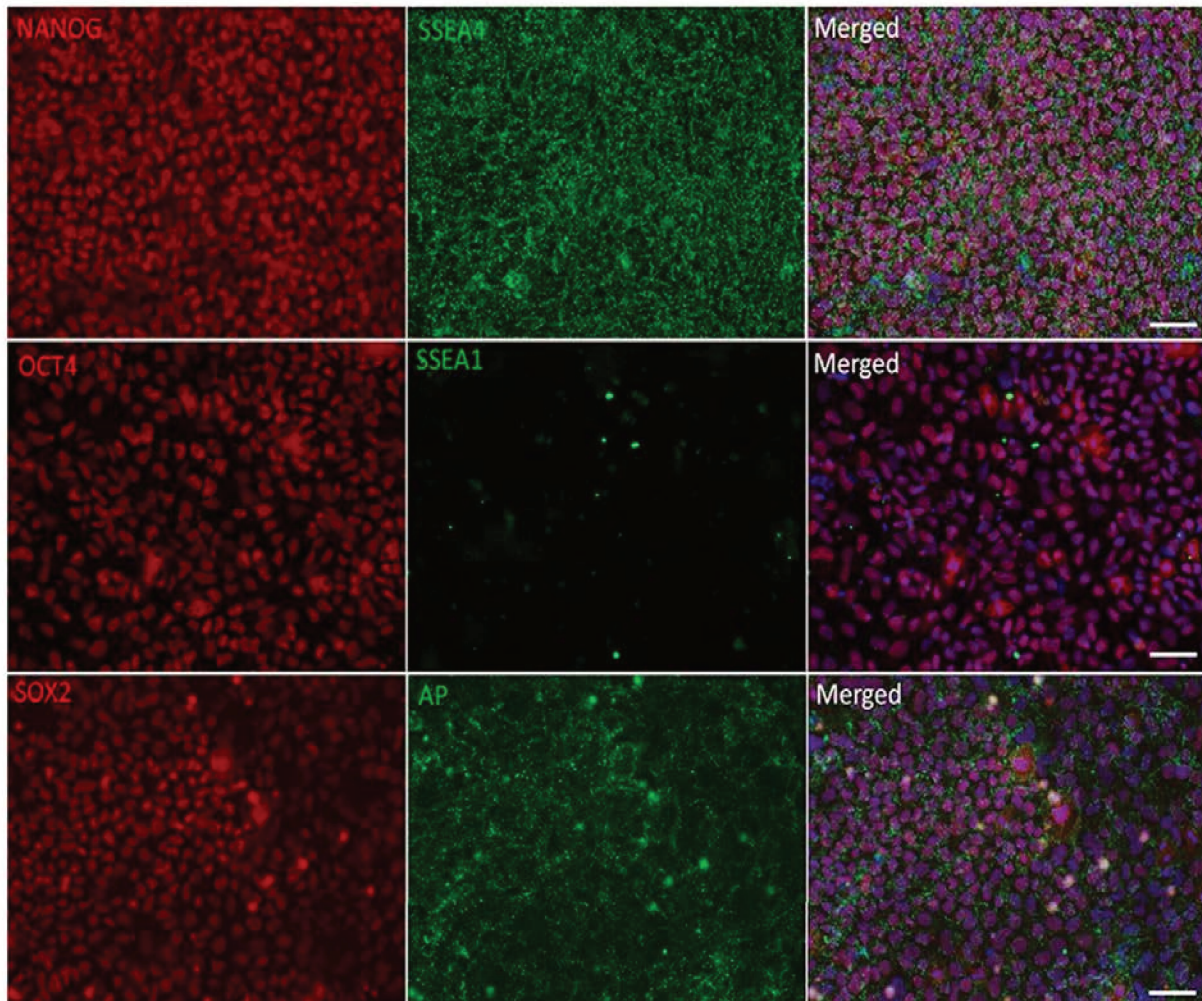


Figure S1. Characterization for pluripotency markers of cultured hiPSCs. Immunostaining of undifferentiated hiPSCs with antibodies specific for pluripotency markers: NANOG, SSEA4, OCT4, SOX2, and AP activity. The pluripotency marker molecules were expressed in virtually all the propagated cells. The immunostaining revealed also the lack of the early differentiation marker. SSEA1 in hiPSCs maintained in DEF-CSTM 500 culture medium. These immunostainings are representative for three hiPSC propagation experiments. Nuclei were stained with Hoescht (blue). Scale bars = 50 μ m. Abbreviations: hiPSCs, human induced pluripotent stem cells; AP, alkaline phosphatase.

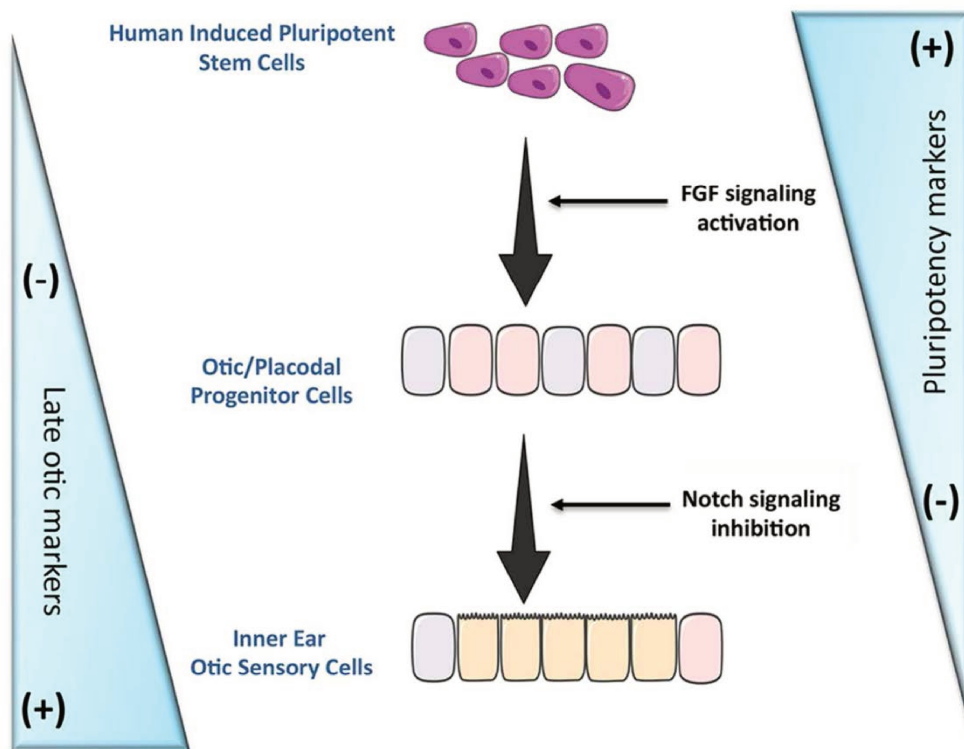


Figure S2. Schematic representation of the generation of inner ear late otic sensory cells from hiPSCs by dual stepwise activation of FGF and inhibition of Notch signaling pathways in adherent monolayer cultures.

	Species	Provider	Reference	Dilution
Alkaline phosphatase	mouse	Life Technologies	Part#962647	1 : 100
DLX5	goat	Santa-Cruz	SC-18152	1 : 50
GATA3	mouse	Santa-Cruz	SC-268	1 : 50
MYO7A	rabbit	Proteus (Coger)	PTS-25-6790-C050	1 : 200
NANOG	goat	Life Technologies	Part#963488	1 : 100
OCT3/4	goat	Life Technologies	Part#962649	1 : 100
PAX2	rabbit	Covance	PRB-276P	1 : 100
PAX8	goat	Covance	SC-16279	1 : 100
POU4F3	mouse	Abnova (Interchem)	H-5459-M01(DB9310)	1 : 100
Sox2	goat	Santa-Cruz	SC-17320	1 : 200
Sox2	rabbit	Millipore	AB5603	1 : 200
SSEA1	mouse	Life Technologies	Part#963489	1 : 100
SSEA4	mouse	Life Technologies	Part#962648	1 : 100

Table S1. List of antibodies used in immunocytochemical marker expression studies

Gene Name	Forward Primer	Reverse Primer
<i>atoh1</i>	GCAATGTTATCCCGTCGTTCAA	TCGGACAAGGCGTTGATGTA
<i>dlx3</i>	AGCCTCCTACCGGCAATAC	TTCCGGCTCCTCCTTAC
<i>dlx4</i>	GTTTCCAGCACACGCAGTAC	GCGTTTGTCTGAAACCAGATCTT
<i>dlx5</i>	GCTAGCTCCTACCACCAGTAC	GGTTTGCCATTACCATTCTCA
<i>dusp6</i>	AGCAGCCCATGTGACAACA	TGCAGAGAGTCCACCTGGTA
<i>eya4</i>	CCCTTGAACAGCAGTGAAACC	GGGCTGTAGCCACTACTTGTA
<i>foxi1</i>	GACAAGCGCCTCACTCTCA	CCGGCCTTGCTCTTGTTGTA
<i>gapdh</i>	ACACCATGGGGAAGGTGAAG	GTGACCAGGCGCCAATA
<i>gata3</i>	CACGGTGCAGAGGTACCC	AGGGTAGGGATCCATGAAGCA
<i>hes1</i>	CAACACGACACCGGATAAAC	TGCTCTTCGTCTTTTCTCCA
<i>hes5</i>	AGCTGCTCAGCCCCAAAGA	TGCTCGATGCTGCTGTTGATG
<i>hes7</i>	ATCAACCGCAGCCTGGAA	TTCTCCAGCTTCGGGTTCC
<i>hmx3</i>	TGGTACCCCTACACCCTGAC	CTCTCAGCAAGGCCTTCTCC
<i>klf4</i>	CTGCGGCAAAACCTACACAA	CGTCCAGTCACAGTGGTAA
<i>lfng</i>	ACTCCACCTGGAGAACC	GCGTTCCGCTTGTTTTCAA
<i>myo7a</i>	TGAGACCCAGTTTGGCATCA	GGTGTCTCGGTTCTTCTCCA
<i>nanog</i>	TGCAGAGAAGAGTGTCGCAAA	GCTGGGTGGAAGAGAACACA
<i>otx1</i>	GACCTCCTGCACCCATCC	CAGCTGTGAACGCGTGAA
<i>otx2</i>	AGGAGGTGGCACTGAAAATCA	CTGTTGTTGGCGGCACTTA
<i>pax2</i>	CGGCTGTGTCAGCAAATCC	GCTTGGAGCCACCGATCA
<i>pax8</i>	GCCCAGTGTGAGCTCCATTA	GCTGTCCATAGGGAGGTTGAA
<i>phox2b</i>	GCCCTGAAGATCGACCTCAC	CGCTCCTGCTTGCGAAA
<i>Pou4f3</i>	CCCCGTAAGTCAAGAACC	CATCAAAGCTTCCAAATATATTACCC
<i>pou5f1</i>	TGGGATATACACAGGCCGATG	GATGGTCGTTTGGCTGAATACC
<i>sall4</i>	CACTGGAGAGAAGCCTTTTGTG	CCCCGTGTGTCATGTAGTGA
<i>sox2</i>	AGCTCGCAGACCTACATGAA	GGAGTGGGAGGAAGAGGTAAC
<i>sox3</i>	GTGTGAAACGGCCCATGAAC	GTGCATCTTGGGGTTCTCCA
<i>spry1</i>	ACCATCCTGTTTGGCCTGTA	GACTAAGCACATGCAGGTTCC

Table S2. List of gene-specific primers used for RT-qPCR for gene expression studies

2. Mécanismes d'action de la voie Wnt dans la différenciation otique et la spécification des cellules ciliées

2.1. Objectifs de l'étude

La technologie des cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC) constitue une avancée majeure dans le traitement des surdités neurosensorielles. En vue d'une thérapie chez l'homme, les hiPSC pourraient offrir un accès illimité à des progéniteurs otiques ainsi qu'à leurs dérivés tels que les cellules ciliées (CC). Elles constitueraient donc un modèle cellulaire idéal pour réaliser des greffes autologues. Cependant, l'une des difficultés liées à l'utilisation des hiPSC réside dans la maîtrise des mécanismes régulant leur différenciation en cellules ciliées *in vitro*. Les études *in vivo* montrent que le développement des cellules ciliées fait intervenir une cascade de voies de signalisation, comme WNT, BMP, FGF, NOTCH... La diversité des voies de signalisation impliquées dans la (ré-)génération de ces cellules rend la compréhension de ce phénomène plus compliquée, ce qui soulève la question de savoir laquelle de ces voies est nécessaire pour la spécification des cellules ciliées.

Cette deuxième étude s'inscrit dans la continuité des travaux présentés précédemment (Article 1). Dans ce travail, nous avons voulu en savoir davantage sur les mécanismes moléculaires à la base de la différenciation des hiPSC en cellules ciliées. Contrairement à l'étude précédente, nous nous sommes ici focalisés sur l'étude des signalisations impliquées dans la différenciation précoce des progéniteurs otiques à partir des hiPSC. Afin d'optimiser notre protocole d'induction, nous sommes intéressés à la modulation *in vitro*, durant la première phase d'induction (J0 à J13), de trois voies de signalisation (FGF, TGF- β et Wnt) impliquées dans la formation de la placode otique et la différenciation des cellules ciliées *in vivo*. Afin de mieux explorer le phénotype de nos cellules différenciées, nous avons fait une analyse approfondie des marqueurs otiques exprimés durant les différents stades de développement embryonnaire, des marqueurs de l'ectoderme non-neural, de la région pré-placodale, de la placode otique et de la cellule ciliée. Le devenir des cellules a été examiné en utilisant plusieurs techniques : immunocytochimie, qPCR, Fluidigm et RNAseq. Les résultats de nos analyses par immunocytochimie et par PCR quantitative montrent que les voies FGF, TGF- β et Wnt sont nécessaires à l'induction otique et que l'inhibition de la voie Wnt durant la première phase d'induction (J1-J6) initie la différenciation et la spécification des cellules ciliées. Nos résultats sont encourageants et ouvrent de nouvelles perspectives pour l'utilisation des hiPSC pour le

traitement de surdités neurosensorielles. Cette étude a donné lieu à la rédaction d'un manuscrit qui sera prochainement soumis pour publication.

2.2. *Article N°2: Modulating FGF, TGF- β and WNT signaling pathways to differentiate human induced pluripotent stem cell into hair cell-like cells.*

Modulating FGF, TGF- β and WNT signaling pathways to differentiate human induced pluripotent stem cell into hair cell-like cells.

Hanae Lahlou¹, Emmanuel Nivet², Alejandra Lopez-Juarez¹, Arnaud Fontbonne¹, Azel Zine^{1,3}

¹ Aix Marseille Université, CNRS, NIA UMR 7260, 13331, Marseille, France

² Aix Marseille Université, CNRS, NICN UMR 7259, 13916, Marseille, France

³ Université de Montpellier, Faculté de Pharmacie, Montpellier, France

ABSTRACT

Sensory hair cells (HCs) are highly specialized mechanoreceptors of the cochlea because of their ability to perceive sound, thus allowing hearing. Understanding mechanisms and factors implicated in HC development is crucial, not only to overcome the physiological disorders of inner ear development, but also to design new therapeutic strategies for hearing repair, including stem cell based-therapy. The latest advances with stem-cell therapy sheds light on how HCs could be generated *in vitro* using different protocols that mimic *in vivo* inner ear development steps, including non-neural ectoderm (NNE), pre-placodal ectoderm (PPE) and otic placodal (OP) stages. In this work, we describe a monolayer method to generate otic cells from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). By manipulating FGF, TGF- β and WNT signaling pathways, we were able to generate 55% of PAX2 positive cells during a short otic induction (6 days). Differentiating cultures first expressed the NNE specific transcription factors TFAP2A, GATA2, GATA3, DLX3, and DLX5, which are crucial in establishing the PPE competence. Subsequently, we observed upregulation of a subset of early OP markers (e.g. PAX2/8, TBX2, EMX2 and OTX1). Furthermore, we noticed abundant expression of late otic markers, notably embryonic HC markers belonging to the *pou* and *myosin* gene families (e.g. *POU4F3*, *MYO15A*), as well as mature HC markers (e.g. *AQP1*, *OTOF*). Taking together, our results showed that FGF3/10 treatment combined to TGF- β and WNT modulation plays essential role in inducing expression of PPE competence factors and eventually transition to the OP phenotype. Of importance, after establishing the OP competence state, the cells were committed to posterior placode precursor fate and started expressing embryonic and mature HC markers. This work provides new knowledge on the cellular and molecular mechanisms required for *in vitro* differentiation of hiPSCs into otic lineage, a first step towards the replacement of damaged HCs and cell-based therapy for inner ear disorders.

Key words: hiPSCs, otic induction, TGF- β , WNT signaling, gene expression, hair cells.

INTRODUCTION

Neurosensory hearing loss is defined as an impairment in the auditory portion of inner ear it can affect the neural pathways of hearing or occur in the cochlea, when hair cells (HCs) are missing or damaged. Several factors can lead to this phenomenon: environmental factors, ototoxic medications, and genetic predispositions all contribute to HC loss. In birds and amphibians, the damaged cells regenerate spontaneously (Ryals and Rubel, 1988; Zheng, 1999). By contrast, mammalian cochlear cells do not regenerate. Neurosensory hearing loss is becoming increasingly frequent and affects a broad range of people worldwide. However, there is no cure for this pathology, except surgery for certain types of hearing loss. Recently, technological advancements in gene and cell therapy have held new hopes for restoring neurosensory hearing loss (reviewed in Duan et al., 2000; Gillespie et al., 2014; Murugasu, 2005)

Over the past two decades, human pluripotent stem cells, either from embryonic origin (Thomson et al., 1998) or obtained by cell reprogramming (Takahashi et al., 2007), have received considerable attention for treating neurosensory hearing loss. Thanks to their self-renewal and pluripotency, they represent a suitable source for the *in vitro* generation of a large number of otic progenitors and their derivatives, including HCs. Many studies have shown that certain stem cells bear the potential to give rise to otic progenitors *in vitro* (Abboud et al., 2016; Costa et al., 2015; DeJonge et al., 2016; Dincer et al., 2013; Ealy et al., 2016; Koehler et al., 2013; Oshima et al., 2010; Ronaghi et al., 2014) and therefore could regenerate damaged HCs *in vivo* to partially restore functional hearing upon transplantation (Chen et al., 2009, 2012). However, available differentiation protocols remain unsatisfactory and require further investigation to obtain functional HCs. To do so, researchers aim at recapitulating the *in vivo* developmental inner ear steps using stem cells *in vitro*. In the human embryo, inner ear originates from the ectoderm, and the first morphological sign of inner ear development is seen, by third week of gestation, as a thickening of non-neural-ectoderm (NNE). NNE, also known as the surface of the ectoderm, is the precursor of pre-placodal ectoderm (PPE), which gives rise to the otic placode (OP) (Graham and Shimeld, 2013; Lim and Brichta, 2016; Whitfield, 2015). The placode gradually invaginates to form first the otic cup and then the otic vesicle or otocyst, that eventually separates from the ectoderm and differentiates into the inner ear. During this process, each stage is recognized by the expression of a panel of gene markers that confers otic identity to the cells. This also involves several signaling pathways, including WNT, TGF- β , BMP, FGF and NOTCH pathways, which are

orchestrated in space and time (Kelley, 2006; Liu et al., 2014; Wu and Kelley, 2012; Zine, 2003). The coordinated action of these signaling pathways and gene expression is essential for normal inner ear development and for the maintenance of auditory processing in the cochlea. When seeking to differentiate otic cells *in vitro*, researchers face the intriguing issue of the mechanisms regulating HC generation. Indeed, the diversity of signaling pathways implicated in inner ear development makes the comprehension of this phenomenon more complicated raising the question: which of these pathways are truly required for HC specification? Thereby, considerable effort has focused on understanding the molecular pathways that regulate HC specification and differentiation, including the Wnt signaling pathway, a critical actor in HC development. During embryonic mouse cochlear development, Wnt signaling is required for initial HC differentiation but not for subsequent maturation and maintenance (Shi et al., 2013, 2014). Numerous studies have characterized the multiple roles of Wnt signaling during *in vivo* cochlear development, notably in promoting HC regeneration (reviewed by Jansson et al., 2015). Furthermore, recent studies have highlighted the importance of Wnt modulation for *in vitro* differentiation of pluripotent stem cells towards otic cells (DeJonge et al., 2016; Ealy et al., 2016; Koehler et al., 2013; Oshima et al., 2010). In a previous study, we used a monolayer culture system with FGF3 and FGF10 to guide otic induction from hiPSCs (Lahlou et al., 2017, unpublished results). We used a fully-characterized hiPSC Chips cell line expressing the hallmarks of pluripotency, as confirmed by immunolabeling for pluripotency markers such as NANOG, Oct3/4, SSEA4 and SOX2, treated them with FGF3 and FGF10 over a period of 13 days and generated otic progenitors. We demonstrated that the obtained progenitors was able to give rise to HC-like cells expressing late otic markers (MYO7A and POU4f3) after 7 days under Notch signaling inhibition. However, our otic induction protocol remained unsatisfactory, as we could not generate efficiently a large numbers of otic cells (at d13 only 30% PAX2 positive cells). Besides, the obtained progenitors showed heterogeneous morphological aspect of differentiated cells. We inferred that this method needed to be improved in order to extend the efficiency of hiPSC conversion into HCs. To improve our otic differentiation protocol, we sought to identify an additional modulator signaling that could normalize or amplify the otic induction process. Since hiPSCs can proliferate indefinitely and give rise to three germinal layers and the inner ear originates from the ectoderm, it is obvious that the differentiation of otic cells from hiPSCs requires suppressing endodermal and mesodermal lineage. This could be achieved by inhibiting WNT and TGF- β signaling pathways, major actors in *in vivo* otic placode development.

Thus, in this work, we asked whether the combined action of FGF3/10 and Wnt modulation could enhance differentiation into otic lineage. To examine this, cells were treated with a Wnt antagonist during the first otic induction days (d1 - d6), followed or not by a Wnt activator (d6 - d13). Cells were collected at different time points to explore the dynamic expression of otic markers using several techniques, ranging from molecular biology to immunocytochemistry. Interestingly, our results showed that Wnt inhibition is required during the early stage of otic induction. Our study thus proposes a new protocol allowing the differentiation of hiPSCs into otic cells. Ultimately, this work may pave the way to the development of more complex differentiation protocols including Wnt modulation as a critical player in the overall process leading to the *in vitro* generation of HCs.

MATERIALS AND METHODS

hiPSC Culture and Maintenance Method

The ChiPSC-4 and ASC iPSC hiPSC lines were provided, respectively, by Cellartis Bioresearch (now Takara Bio Europe AB, Göteborg, Sweden) and by Applied StemCell, Inc. (California, USA). Both cell lines were derived from fibroblasts of healthy human donors and reprogrammed by using polycistronic retrovirus technology, based on the transduction of Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc transcription factors [Takahashi et al., 2007]. ChiPSC-4 and ASC iPSC cell lines were maintained using two proprietary feeder-free systems.

Cells from the ChiPSC-4 line were plated at a density of 40,000 -50,000 cells/cm² onto dishes coated with a DEF-CS™ COAT-1 matrix (Cellartis), diluted at 1:20 in D-PBS (+/+) (Gibco® by Life Technologies). Cells were expanded in DEF-CS™ 500 basal medium, daily supplemented with DEF-CSTM GF-1 (1:333), GF-2 (1:1000) and GF-3 (1:1000) additives (Cellartis). When the cells were confluent at 80-90% (about 5-7 days), they were passaged using TrypLE Select® (Life Technologies). The cells grew very quickly, and in less than a week, we could proceed to the second passage, seeding the cells on a larger surface, and so on, until having several millions of cells. Pluripotency of reprogrammed cells was confirmed by qRT-PCR and immunostaining for OCT4, NANOG, SEEA1, SEEA4 and SOX2 (as demonstrated in our previous study, Lahlou et al., 2017 unpublished results).

Regarding the ASC iPSC cells, they were cultured in chemically-defined StemMACS iPS-Brew medium (Miltenyi Biotech) on growth factor reduced matrigel (Corning) coated plates. Briefly, 70–80% confluent iPSCs were treated with diluted EDTA (Gibco) for 3-5 min at 37°C and the

colonies were dispersed to small clusters and lifted carefully using a 5 mL glass pipette at a ratio of 1:4. Both cell lines were maintained in an incubator (37 °C, 5% CO₂) with medium changes every day.

Otic placode induction

Undifferentiated hiPSCs were dissociated to single cells using TrypLE Select® (Life Technologies) and plated on laminin-coated wells (1.5 µg/cm²; R&D Systems) at a density of 30,000 cells/cm². For the first day of seeding, cells were cultured in DFNB basal medium (DMEM/F12 with N2 and B27, Gibco® by Life Technologies), supplemented with fibroblast growth factors, FGF3 (50 ng/mL), FGF10 (50 ng/mL) (R&D Systems) and 10 µM of ROCK inhibitor Y-27632 (STEMCELL Technologies). From day 2 of differentiation, the medium was replaced with induction medium: DFNB medium supplemented with 50 ng/mL FGF3, 50 ng/mL FGF10, 10 µM SB431542 (TGFβ inhibitor, Stemgent) and 100 ng/mL of recombinant human Dickkopf-related protein (rhDKK1) (WNT inhibitor, R&D Systems). Medium was replaced every other days until day 6. Afterward, it was supplemented with 50 ng/mL recombinant human WNT3A (WNT agonist, R&D Systems) instead of SB431542 and rhDkk1. Medium was replaced every 2 days until day 13.

Late otic cell differentiation

To induce differentiation into late otic cells, the obtained progenitors from day 13 were dissociated to single cells using TrypLE Select® (Life Technologies) and transferred onto polyornithin/laminin-coated wells (0.5 mg/mL and 1.5 µg/cm² respectively; R&D Systems) at a density of 80,000 cells/cm². Cells were maintained in DFNB medium supplemented with 10⁻⁶M retinoic acid (RA; Sigma) and 20 ng/mL epidermal growth factor (EGF; R&D Systems). The medium was replaced every 2 days until day 27.

Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

Total RNA was extracted from undifferentiated and differentiated cells using the PureLink® RNA Mini Kit (Life Technologies) according to manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 1 µg of RNA per sample, using High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Life Technologies), and 5 µl of cDNA were submitted to qPCR reaction. Quantitative RT-PCR was performed with TaqMan® Fast Real Time PCR System, according to the manufacturer's recommendations (Applied Biosystems, Life Technologies). Primer pairs used are listed in

Table S1 (in the Supplemental information). For each experiment, all cDNA samples were analyzed in duplicate. Relative gene expression values were determined using the comparative $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ method after normalization to the *gapdh* housekeeping gene [Livak and Schmittgen, 2001].

Fluidigm assay

After pre-amplification PCR, cDNA was diluted 10-fold in DNA suspension buffer (Teknova) and used for the Fluidigm pre-amplification step for Dynamic Array gene expression analysis: cDNA was pre-amplified for 14 cycles with 500 nM DELTA gene pooled primer mix using 2x Taqman PreAmp Master Mix (Invitrogen), followed by Exo1 treatment (NEB). 5-fold diluted Exo1 treated pre-amplified cDNA was used for loading the 96.96 Dynamic Array chip on the Fluidigm Biomark HD. See **Table S1** for a comprehensive list of primers used for gene expression analysis. The data were analyzed with Real-Time PCR Analysis Software in the BioMark instrument. Ct values were processed by automatic threshold for all assays, with derivative baseline correction using BioMark Real-Time PCR Analysis Software 4.1.3 (Fluidigm).

RNAseq library construction

The RNAseq libraries was constructed according to the TrueSeq Stranded (Illumina) protocol. We first purified and fragmented 500 ng of total RNA. We then synthesized cDNA (1st strand and 2nd strand), adenylated the 3' ends and added adapters. We amplified the cDNA by PCR. The obtained libraries were controlled with LabChip GX Touch microfluidics (Perkin Elmer platform): each was run on a polyacrylamide gel and must appear as a smear, revealing a high-complexity RNAseq library, and not as a discrete band. All libraries were validated, then normalized and pooled. Finally, sequencing and base calling were performed using the Illumina MiSeq platform (approved ISO9001:2008), using the Paired-end reads 2×150 bp method, and sequences were obtained after purity filtering.

Immunocytochemistry and Microscopy

In vitro differentiated cells were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 15-20 min at room temperature. Unspecific binding was blocked in 0.3% Triton X-100 and 3% bovine serum albumin in PBS for 30 min at room temperature. Then, samples were incubated overnight at 4°C with specific primary antibodies diluted in the same buffer without

Triton X-100, we used : mouse anti-GATA3 (1/50, Santa-Cruz), rabbit anti-PAX2 (1/100, Covane), goat anti-GATA3 (1/50, Santa-Cruz), mouse anti-POU4F3 (1/100, Abnova, Interchim) and rabbit anti-MYO7A (1/200, Proteus, Corger). Then, cells were rinsed (3×5 min) in PBS and incubated for 1 hours at RT with cross-adsorbed Alexa- Fluor 488- or 594-conjugated anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies (1/500, Jackson Immunoresearch, West Grove) in the dark. The nuclei were counterstained with Hoechst blue #33342 (1:1000, Sigma-Aldrich). Control experiments including negative controls without primary antibodies were processed in parallel. Samples were mounted using Prolong Gold Antifading reagent (Life Technologies) on Superfrost glass slides (). The images were acquired with a Zeiss Axioimager/LSM 5 Exciter fluorescence or a LSM 710 NLO Zeiss (Carl Zeiss) confocal microscope and the Zen software (Zeiss, Jena, Germany).

Cell counting

The cells were counted manually using graphic tools of the Zeiss computer software (Zen 2012, blue edition). The fraction of immunopositive-cells among the total number of cells identified by Hoechst nuclear staining was determined in ten fields per coverslip in each *in vitro* condition. Three independent experiments were conducted for each determination and data were expressed as mean \pm SEM.

Statistical analysis

Graph Pad Prism software was used for statistical analysis. All results are presented as the mean \pm SEM (standard error of the mean) of the independent experiments. Data were analyzed using Student's t-test or one-way ANOVA. Differences between means were tested by Mann-Whitney test. Statistical difference was reported for p-values below 0.05, an asterisk indicates significant differences between means (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).

RESULTS

Wnt inhibition combined to FGF3/10 and TGF- β treatment enhances otic differentiation

To initiate otic differentiation from hiPSCs, dissociated ChiPSC-4 cells were cultured using our monolayer culture system and treated with FGF3/10, TGF- β inhibitor (SB431542) and WNT inhibitor (Dkk1) until day 6 (**Fig. 1A**). In order to select the combination of these molecules that yielded the best otic induction, we systematically tested these four conditions: (i) FGF3/10 alone, (ii) combined with Dkk1, (iii) or with SB and (iv) FGF3/10 + SB + Dkk1, referred to respectively as FGF3/10, FD, FSB and FSBD. The progenitors obtained at day 6 were collected and analyzed by immunocytochemistry, by (i) classical RT-qPCR, (ii) Fluidigm assays, where integrated fluidic circuits allow automated PCR reactions in nanoliter volumes to detect unique molecular signatures in individual cells or rare cell populations, or (iii) using next-generation sequencing (RNAseq) technic that offers a higher sensitivity to detect changes in gene expression compared to other techniques, and which can measure the expression of both known and unknown genes.

To examine the fate of differentiated cells, we first explored the dynamic expression of preselected genes overexpressed during the early stage of inner ear development. RT-qPCR demonstrated abundant expression of NNE/PPE markers: *DLX3/5/6*, *GATA2/3*, *TFAP2A*, *EYA2*, *MSX2*, *SIX1*, *DACHI*, *FOXI1* and *FOXI3*, notably in FSBD treatment. This expression was significantly more important when compared to FGF3/10 alone and also to FD treatment (**Fig. 1B**).

As described above, in *in vivo* inner ear development, NNE/PPE is preceded by the OP stage. When we looked at OP marker expression, we observed an upregulation of *PAX2/8*, *SOX9*, *TBX2*, *EMX2* and *OTX1*, key otic placode markers. Their expression was significantly more important in FSBD treatment when compared to FGF3/10 alone, FD and FSB treatments (**Fig. 1C**). Moreover, the upregulation of some early otic markers were confirmed by RNAseq data, mainly for *DLX5*, *GATA3*, *EYA1*, *SIX1* and *PAX2* (**Fig. 5A**). Our results support the importance of FGF, WNT and TGF- β signaling for otic induction. We postulate that FGF3/10 treatment combined with WNT and TGF- β inhibition (SB + Dkk1) would be an effective condition to derive otic cells from hiPSCs at this critical time point of differentiation (day 6).

To further explore the efficiency of our protocol, we examined the expression of otic markers by immunostaining. We were particularly interested in transcription factors belonging to the PAX, DLX and GATA families, necessary to define the otic phenotype (Whitfield, 2015). We looked at the expression of PAX2, GATA3 and DLX5 by immunochemistry (**Fig. 1D-G**). Generated cells were positive for these markers, including subsets of differentiated cells that were doubly immunopositive (i.e. for GATA3 and DLX5), indicating that these cells had acquired an early otic lineage phenotype. We quantified the cells expressing PAX2, a robust marker of otic placode during mouse inner ear development (Bouchard et al., 2010; Burton et al., 2004; Christophorou et al., 2010). Fascinatingly, 55 % (± 3 %, *** $p = 0008$) of cells differentiated with FGF3/10, SB and Dkk1 were positive for PAX2 compared to only 13 % (± 2 %) under FGF3/10 treatment alone (**Fig. 2D**).

In order to evaluate the reproducibility of our inner ear induction protocol, we tested the same protocol on another hiPSC line, the ASC iPSC line. Relative gene expression and immunocytochemistry data showed similar results: we observed an upregulation of NNE/PPE otic markers using FGF3/10, SB and Dkk1 (**supplementary Fig. 7**). Therefore, treating with FGFs and inhibiting TGF- β and WNT signaling pathways strongly enhances early otic differentiation.

Gene expression profiling at day 13 reveals robust otic induction

Many studies reported that Wnt activation greatly affects *in vivo* otic development (Chai et al., 2012; Liu et al., 2016; Ohyama et al., 2006). It can also enhance the production of mouse inner ear organoids *in vitro* (DeJonge et al., 2016; Koehler et al., 2017). Thus, we wondered whether prolonging the culture time in the presence of Wnt activator could promote differentiation into more specialized otic cells. To examine this, otic progenitors from day 6 were treated until day 13 with either FGF3/10 alone or combined with Wnt3a (a Wnt agonist) (**Fig. 2A**). The generated cells were collected from different conditions to explore their cell fate with immunocytochemistry and qPCR.

At day 13, relative gene expression showed that cells, from FSBD + Wnt3a treatment, simply maintained the expression of NNE and OP gene makers (e.g. *DLX5/6*, *GATA3*, *TFAP2A*, *PAX8*, *TBX2*, and *EMX2*). When compared to day 6 some markers showed a decline in their expression level (e.g. *DLX5/6* and *PAX2*), however no significant difference was seen (**Fig. 2B-C**). To support this result, we also quantified PAX2-expressing cells at this time point

(d13) after Wnt activation (**Fig. 2E - I'**): the number of PAX2 immunopositive cells dropped markedly, as more than half of the generated otic progenitors lost their PAX2 expression ($55\% \pm 3\%$ at d6 vs $20\% \pm 2\%$ at d13) (**Fig. 2D**). These data confirm the qPCR results, indicating that Wnt activation could abolish the expression of some early otic markers, which suggest that cells were engaged committed to the otic lineage, and could express late otic markers. In parallel to otic gene profiling, we looked at pluripotency markers at different time points of differentiation. Using RNAseq, we noticed a sudden drop of pluripotency-related markers (**Figure 2G**), confirming that most cells had lost their pluripotency and acquired an otic phenotype. To further explore the effect of Wnt activation on otic induction, we examine the expression of early otic markers in FGF3/10 alone (**Fig. 3A**), FGF3/10 + Wnt3a (from d6) (**Fig. 3B**) and FSBD + FGF3/10 (**Fig. 3C**) treated cells. In all tested conditions, early otic markers were upregulated. However, their expression level varied considerably from one condition to another. Interestingly, in the absence of Wnt3a, FSBD + FGF3/10 treated cells, the expression profile of early otic markers was comparable to FSBD + Wnt3a treated cells, no significant differences were seen. These data suggest that Wnt activation does not promote the expression of early otic markers, it induces probably differentiation into hair cell lineage.

To further test our hypothesis that Wnt activation enhances otic specification, we looked at the expression of embryonic and mature HC markers at day 6 and 13. Overall, our qPCR results demonstrated an upregulation of HC markers at day 13. When compared to day 6, we noticed a significant increase in the expression of several embryonic HC markers, notably those belonging to the *pou* and *myosin* gene families (*MYO6A*, *POU4F3*, and *MYO15A*) and also mature HC markers (*AQP1*, *OTOF*, *TMC4* and *LBH*) (**Fig. 4E-D**).

Since *POU4F3* and *MYO7A* define the HC lineage, and are thus required for inner ear HC maturation and survival (Sahly et al., 1997; Xiang et al., 1997), we examined their expression by immunocytochemistry in our differentiated cells at different time points (d6 and d13). From day 6, immunostaining showed the presence of *POU4F3* and *MYO7A* positive cells a (**Fig. 4A-D'**) and at day 6 and 13, a subset of differentiated cells co-expressed both markers.

Taken together, our qPCR and immunocytochemistry analyses indicate that cells had acquired an otic phenotype, and a subset of differentiated progenitors were already committed to the late otic lineage. To further support these results, we performed a quantitative transcriptome study using next-generation sequencing (RNAseq). We selected three culture conditions at

different time points of differentiation: undifferentiated cells from d0, differentiated cells from the FSBD condition stopped at d6, or maintained until d13 under FGF3/10 and Wnt3a treatment. The obtained data identified 899 differentially expressed transcripts in d0 vs d6, and 1272 transcripts in d0 vs d13. Among those, 339 upregulated transcripts and 309 downregulated transcripts were common between d6 and d13 (**supplementary Fig. 8A**). Among upregulated transcripts, we identified 15 candidates common with our preselected genes quantified with Fluidigm (**supplementary Fig. 8B**).

We then compared the differential mRNA expression in differentiated cells between d0, d6 and d13 samples using the normalized read count. The number of reads reflects the abundance of mRNA of early and late otic markers at d6, however, when compared to d13 no significant differences were seen (**Fig. 5A,B**). These data confirm the Fluidigm results described above which showed upregulation of DLX5, GATA3, PAX2, MYO7A and MYO15A. In addition, with read counts, we were curiously surprised to find the presence of cell matrix genes belonging to the collagen gene family (**Fig. 5B and supplementary Fig. 9**), for which read numbers varied of over a thousand fold change, their expression being more important at d13 when compared to d6 (e.g. COL1A1, COL1A2, COL2A1 and COL5A1).

To sum up, whether from Fluidigm assay, RNAseq or immunocytochemistry analysis, our results correlate with each other, supporting the robustness of our otic induction protocol, which shows the importance of modulating FGF, TGF- β and WNT signaling pathways to differentiate hiPSCs into otic cells.

Early Wnt inhibition initiates differentiation into late otic lineage

To confirm if the expression of HC markers directly results from Wnt activation, we compared gene expression in differentiated cells in the presence/absence of Wnt activator (only FGF3/10 from d6 – d13). Surprisingly, in the absence of Wnt3a at this stage, the expression of late otic markers shows the same profile as in the presence of Wnt agonist (**Fig. 6A,B**). This result suggests that the expression of late otic markers simply requires the double inhibition of TGF- β and Wnt signaling pathways during the first step of otic induction (d1-d6). To test our hypothesis, we examined the expression of the same selected genes in the absence of SB and Dkk1 (from d1-d6). The cells were maintained in FGF3/10 from d1 until d13 and treated with Wnt3a from day 6. When compared to day 0, mRNA expression analysis

showed no change in the expression level of embryonic/mature HC markers, suggesting that cell fate at day 13 is a long-term results of WNT and TGF- β inhibition until d6, and not of subsequent Wnt activation.

Altogether, our qPCR and immunocytochemistry results confirm that FGF3/10 with TGF- β and WNT inhibition are efficient to induce otic differentiation of hiPSCs and to initiate HC phenotype. Since the expression of late otic markers showed no significant difference at day 13 either in the absence or presence of Wnt activator, we deduced that FGF3/10 (from d6) were sufficient to give rise to hair cell-like cells from SB + Dkk1 treated cells. To conclude, the combined action of FGF3/10, TGF- β and WNT is of critical importance for *in vitro* inner ear cell development and should be included in protocols to generate hiPSC-derived late otic cells.

DISCUSSION

Generation of human inner ear cell types has become increasingly plausible due to development of stem cell-based therapy (Martinez-Monedero and Edge, 2007). Understanding *in vivo* inner ear developmental steps unraveled the mysteries of *in vitro* HC regeneration (Basch et al., 2016; Franco and Malgrange, 2017). Nevertheless, existing protocols allowing differentiation of HCs from stem cells remain controversial and are continuously evolving. In particular, the ability to produce HCs from stem cells requires a good knowledge about signals and molecular mechanisms regulating inner ear development and HC differentiation. Several factors have been shown to be involved in these processes, including WNT, BMP, FGF, and NOTCH signaling pathways (Atkinson et al., 2015; Galvez et al., 2017; Mittal et al., 2016; Nakajima, 2015). In this work, we were particularly interested in the Wnt signaling pathway, widely known for its role in inner ear development: it is implicated in regulating both proliferation and HC differentiation (Geng et al., 2016; Jacques et al., 2013, 2014; Ohyama et al., 2006), in determining the size of the otic placode (DeJonge et al., 2016; Head et al., 2013; Jayasena et al., 2008), in controlling the development of the inner ear neural and sensory components (Matsuoka et al., 2017) and also in trans-differentiating supporting cells into HC (Shi et al., 2012, 2013).

Our study sought to better define Wnt role in *in vitro* HC differentiation by adopting a stepwise protocol closely based upon known *in vivo* developmental stages. Our aim was to attempt the generation of otic cells from hiPSCs by systematically exploring signals promoting

differentiation into otic lineage. In our culture protocol, in addition to FGF3/10 treatment, we blocked TGF- β and WNT signaling from d1 until d6 (**Fig. 1A**). Subsequently, obtained progenitors were maintained in FGF3/10 alone or associated to a Wnt activator (d6-d13) (**Fig. 2A**). Our results showed that, during the first step of otic induction, FGF3/10 treatment combined to a dual inhibition of TGF- β and WNT signaling enhances differentiation of hiPSCs into early (**Fig. 1, 2 and 5A**) and late otic lineage (**Fig. 4 and 5B**).

To measure the efficiency of our otic induction protocol, we used a multiparallel quantitative mRNA approaches and immunocytochemistry analysis. In order to ravel out the lack of specific human otic lineage markers, that could impedes identification and isolation of human otic lineage cells, we explored the dynamic expression of a panel of preselected genes recognized in NNE, PPE, OP and HC stages.

Contrasting to the results obtained by Chen *et al* using only FGF3 and FG10 guidance for otic induction (Chen *et al.*, 2012), we noticed here an abundant and significant upregulation of NNE/PPE (*DLX3/5/6*, *GATA2/3*, *TFAP2A*, *EYA/2*, *MSX2*, *SIX1*, *DACHI*, *FOXI1* and *FOXI3*) (**Fig. 1B**) and OP (*PAX2/8*, *SOX9*, *TBX2*, *EMX2* and *OTX1*) (**Fig. 1C**) gene markers under FGF3/10 treatment associated to TGF- β and WNT inhibitors from d1 until d6. Interestingly, in these conditions, we were able to generate 55% of PAX2 positive cells, robust otic placode marker, versus only 12% upon FGF3/10 alone (**Fig. 2D**). These two fibroblast growth factors act in the formation of the otic territory (Alvarez, 2003; Wright, 2003; Zelarayan *et al.*, 2007). Nevertheless, our results showed that they are not competent enough to induce the transition of hiPSCs to the otic lineage. We demonstrated that the action of FGF3 and FGF10 must be consolidated and associated to TGF- β and WNT inhibitors to amplify otic induction. Consequently, our empirically-defined guidance protocol supports the implication of TGF- β and WNT inhibition for otic induction. To further decipher the effect of Wnt inhibition on HC differentiation, we looked at a subset of embryonic and mature HC markers. Curiously, immunocytochemistry results indicated that our progenitors start expressing POU4F3 and MYO7A from d6 (**Fig. 4A-D**), two late otic markers required for HC differentiation and survival. In mouse cochlea, POU4F3 expression is initiated around embryonic day 13 (E13), just after that of ATOH1 and preceding myosin MYO7A (E15) (Bermingham *et al.*, 1999; Chonko *et al.*, 2013; Masuda *et al.*, 2012; Sahly *et al.*, 1997; Xiang *et al.*, 1997). These data suggest that cells were engaged in committed to posterior placode precursor fate and started expressing HC markers.

To further explore the role of Wnt in HC differentiation and specification, we wondered whether Wnt activation will promote differentiation into HC lineage, as demonstrated by DeJong *et al* using mouse embryonic and induced pluripotent stem cells (DeJong *et al.*, 2016) and also Koehler *et al* with hiPSCs (Koehler *et al.*, 2017). Thus, cells were treated with Wnt agonist from d6 until d13. Quantitative RT-PCR demonstrated upregulation of a subset of embryonic HC markers belonging to the *pou* and *myosin* gene family (including POU4F3 and MYO7A) and also mature HC markers (e.g *AQP1*, *OTOF*, *TMC4*, *CHRNA10* and *LBH*) (**Fig. 4**). The expression of these late otic markers was significantly more important at d13 whether in the presence (**Fig. 4E,F**) or absence (**Fig. 6A,B**) of Wnt activator. Our results are opposite to those obtained by DeJong and Koehler, showing that Wnt activation does not have any effect on HC differentiation. The upregulation of late otic markers at d13 in the absence of Wnt activator suggest that cells were already committed to the late otic lineage and that the expression of these markers may be a long-lasting effect of Wnt inhibition during the first step of otic induction. Contrary our protocol, DeJong *et al.* compared different concentrations of a Wnt agonist (0, 1, 3, and 10 μ M of the CHIR molecule), and they found that 3 μ M CHIR represented the optimal condition for generating a large number of Myo7a positive cells. Based on this, to better understand the role of Wnt activation in our protocol, it could be interesting to see dose-dependent effects of Wnt3a in our model at different time points.

To summarize, in this work we demonstrate that Wnt inhibition is necessary for otic differentiation from hiPSCs, since it promotes otic induction and initiate HC specification. In fact, the importance of Wnt signaling pathways, has been previously described *in vitro*, whether using embryonic or adult stem cells under different culture system: monolayer (Ealy *et al.*, 2016), embryonic bodies (2D system) (Ronaghi *et al.*, 2014) and organoid guidance (3D system) (Koehler and Hashino, 2014; Koehler *et al.*, 2013). However, in most of these studies, it was difficult to obtain a large number of otic cells, they showed not more than 30% of otic generated cells expressing PAX2, after a long period of otic induction, at least 12 *div*. While, with our otic guidance protocol we were able to generate 55% PAX2 positive during only 6 days under FGF3/10 with TGF- β and Wnt inhibitors (**Fig. 2D**). Moreover, they did never see the expression of late otic makers rather early as obtained with our protocol, cells start expressing MYO7A and POU4F3 from day 6 (**Fig. 4**).

The presence of embryonic and mature HC markers at day 13 raised the question of whether the cells were developing stereocilia bundle, structure involved in the mecano-transduction process, which confer HC identity and specificity. To answer this question, we looked at the

expression of ESPN maker, protein belonging to actin bundling family, localized in the stereocilia of HC (Sekerková et al., 2006). Unfortunately, ESPN protein was not detected with immunocytochemistry. Thus, in order to explore more the phenotype of our generated cells, further studies are needed to examine the maturity of cells, using other approaches, like scanning electron microscopy and electrophysiological analysis to explore if the generated cells form stereociliary bundles and are functional.

In addition to all results described above, RNAseq data indicated abundant expression of matrix genes belonging to the collagen family (**Fig. 5 and supplementary Fig. 9**). These genes are expressed in human and mouse cochlea and are essential for hearing. Indeed, their mutation causes hereditary non-syndromic deafness with inner ear malformation (Asamura et al., 2005; Rost et al., 2014; Sivakumaran et al., 2006; Suzuki et al., 2005; Usami et al., 2008). The role of collagen genes is poorly documented *in vitro*, and to our knowledge, no study of stem cell differentiation has demonstrated their function. Our work may thus provide new candidate genes necessary for HC differentiation. Altogether, our finding provides a useful protocol to study signals involved in HC subtype specification, topic that is less understood. Likewise, the guidance method outlined here underscore the importance of Wnt signaling in HC specification and offers a promising approach to enhance HC differentiation using hiPSCs.

CONCLUSION

Our findings underscore Wnt inhibition as a promising approach for enhancing HC specification and differentiation from hiPSCs. Thus, we recommend manipulating Wnt signaling when designing cell culture protocols to develop therapies against deafness and balance disorders caused by HC loss or dysfunction. Although several obstacles need to be overcome before transplanted cells derived from hiPSCs can allow HC regeneration *in vivo*, we believe that our improved culture protocol is a first step in the right direction.

BIBLIOGRAPHY

Abboud, N., Fontbonne, A., Watabe, I., Tonetto, A., Brezun, J.M., Feron, F., and Zine, A. (2016). Culture conditions have an impact on the maturation of traceable, transplantable mouse embryonic stem cell-derived otic progenitor cells. *J Tissue Eng Regen Med*.

Alvarez, Y. (2003). Requirements for FGF3 and FGF10 during inner ear formation. *Development* 130, 6329–6338.

- Asamura, K., Abe, S., Imamura, Y., Aszodi, A., Suzuki, N., Hashimoto, S., Takumi, Y., Hayashi, T., Fässler, R., Nakamura, Y., et al. (2005). Type IX collagen is crucial for normal hearing. *Neuroscience* 132, 493–500.
- Atkinson, P.J., Huarcaya Najarro, E., Sayyid, Z.N., and Cheng, A.G. (2015). Sensory hair cell development and regeneration: similarities and differences. *Development* 142, 1561–1571.
- Basch, M.L., Brown, R.M., Jen, H.-I., and Groves, A.K. (2016). Where hearing starts: the development of the mammalian cochlea. *J. Anat.* 228, 233–254.
- Bermingham, N.A., Hassan, B.A., Price, S.D., Vollrath, M.A., Ben-Arie, N., Eatock, R.A., Bellen, H.J., Lysakowski, A., and Zoghbi, H.Y. (1999). *Math1*: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science* 284, 1837–1841.
- Bouchard, M., de Caprona, D., Busslinger, M., Xu, P., and Fritzsche, B. (2010). *Pax2* and *Pax8* cooperate in mouse inner ear morphogenesis and innervation. *BMC Dev. Biol.* 10, 89.
- Burton, Q., Cole, L.K., Mulheisen, M., Chang, W., and Wu, D.K. (2004). The role of *Pax2* in mouse inner ear development. *Dev. Biol.* 272, 161–175.
- Chai, R., Kuo, B., Wang, T., Liaw, E.J., Xia, A., Jan, T.A., Liu, Z., Taketo, M.M., Oghalai, J.S., Nusse, R., et al. (2012). Wnt signaling induces proliferation of sensory precursors in the postnatal mouse cochlea. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 8167–8172.
- Chen, W., Johnson, S.L., Marcotti, W., Andrews, P.W., Moore, H.D., and Rivolta, M.N. (2009). Human Fetal Auditory Stem Cells Can Be Expanded In Vitro and Differentiate Into Functional Auditory Neurons and Hair Cell-Like Cells. *Stem Cells* 27, 1196–1204.
- Chen, W., Jongkamonwiwat, N., Abbas, L., Eshtan, S.J., Johnson, S.L., Kuhn, S., Milo, M., Thurlow, J.K., Andrews, P.W., Marcotti, W., et al. (2012). Restoration of auditory evoked responses by human ES-cell-derived otic progenitors. *Nature* 490, 278–282.
- Chonko, K.T., Jahan, I., Stone, J., Wright, M.C., Fujiyama, T., Hoshino, M., Fritzsche, B., and Maricich, S.M. (2013). *Atoh1* directs hair cell differentiation and survival in the late embryonic mouse inner ear. *Dev. Biol.* 381, 401–410.
- Christophorou, N.A.D., Mende, M., Lleras-Forero, L., Grocott, T., and Streit, A. (2010). *Pax2* coordinates epithelial morphogenesis and cell fate in the inner ear. *Dev. Biol.* 345, 180–190.
- Costa, A., Sanchez-Guardado, L., Juniat, S., Gale, J.E., Daudet, N., and Henrique, D. (2015). Generation of sensory hair cells by genetic programming with a combination of transcription factors. *Development* 142, 1948–1959.
- DeJonge, R.E., Liu, X.-P., Deig, C.R., Heller, S., Koehler, K.R., and Hashino, E. (2016). Modulation of Wnt Signaling Enhances Inner Ear Organoid Development in 3D Culture. *PLOS ONE* 11, e0162508.
- Dincer, Z., Piao, J., Niu, L., Ganat, Y., Kriks, S., Zimmer, B., Shi, S.-H., Tabar, V., and Studer, L. (2013). Specification of Functional Cranial Placode Derivatives from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep.* 5, 1387–1402.
- Duan, M.L., Ulfendahl, M., Ahlberg, A., Pyykkö, I., and Borg, E. (2000). [Future cure of hearing disorders? Gene therapy and stem cell implantation are possible new therapeutic alternatives]. *Lakartidningen* 97, 1106–1108, 1111–1112.
- Ealy, M., Ellwanger, D.C., Kosaric, N., Stapper, A.P., and Heller, S. (2016). Single-cell analysis delineates a trajectory toward the human early otic lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 8508–8513.

- Franco, B., and Malgrange, B. (2017). Concise Review: Regeneration in Mammalian Cochlea Hair Cells: Help from Supporting Cells Transdifferentiation. *Stem Cells* 35, 551–556.
- Galvez, H., Abello, G., and Giraldez, F. (2017). Signaling and Transcription Factors during Inner Ear Development: The Generation of Hair Cells and Otic Neurons. *Front Cell Dev Biol* 5, 21.
- Geng, R., Noda, T., Mulvaney, J.F., Lin, V.Y., Edge, A.S., and Dabdoub, A. (2016). Comprehensive expression of Wnt signaling pathway genes during development and maturation of the mouse cochlea. *PLoS One* 11, e0148339.
- Gillespie, L.N., Richardson, R.T., Nayagam, B.A., and Wise, A.K. (2014). Treating hearing disorders with cell and gene therapy. *J. Neural Eng.* 11, 065001.
- Graham, A., and Shimeld, S.M. (2013). The origin and evolution of the ectodermal placodes. *J. Anat.* 222, 32–40.
- Head, J.R., Gacioch, L., Pennisi, M., and Meyers, J.R. (2013). Activation of canonical Wnt/ β -catenin signaling stimulates proliferation in neuromasts in the zebrafish posterior lateral line: Wnt Signaling Controls Neuromast Proliferation. *Dev. Dyn.* 242, 832–846.
- Jacques, B.E., Puligilla, C., Weichert, R.M., Ferrer-Vaquer, A., Hadjantonakis, A.-K., Kelley, M.W., and Dabdoub, A. (2013). A dual function for canonical Wnt/ β -catenin signaling in the developing mammalian cochlea. *Development* 140, 247–247.
- Jacques, B.E., Montgomery, W.H., Uribe, P.M., Yatteau, A., Asuncion, J.D., Resendiz, G., Matsui, J.I., and Dabdoub, A. (2014). The role of Wnt/ β -catenin signaling in proliferation and regeneration of the developing basilar papilla and lateral line: Wnt/ β -Catenin in BP and Lateral Line HCs. *Dev. Neurobiol.* 74, 438–456.
- Jansson, L., Kim, G.S., and Cheng, A.G. (2015). Making sense of Wnt signaling—linking hair cell regeneration to development. *Front. Cell. Neurosci.* 9.
- Jayasena, C.S., Ohyama, T., Segil, N., and Groves, A.K. (2008). Notch signaling augments the canonical Wnt pathway to specify the size of the otic placode. *Development* 135, 2251–2261.
- Kelley, M.W. (2006). Hair cell development: commitment through differentiation. *Brain Res* 1091, 172–185.
- Koehler, K.R., and Hashino, E. (2014). 3D mouse embryonic stem cell culture for generating inner ear organoids. *Nat. Protoc.* 9, 1229–1244.
- Koehler, K.R., Mikosz, A.M., Molosh, A.I., Patel, D., and Hashino, E. (2013). Generation of inner ear sensory epithelia from pluripotent stem cells in 3D culture. *Nature* 500, 217–221.
- Koehler, K.R., Nie, J., Longworth-Mills, E., Liu, X.-P., Lee, J., Holt, J.R., and Hashino, E. (2017). Generation of inner ear organoids containing functional hair cells from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 35, 583–589.
- Lim, R., and Brichta, A.M. (2016). Anatomical and physiological development of the human inner ear. *Hear Res* 338, 9–21.
- Liu, L., Chen, Y., Qi, J., Zhang, Y., He, Y., Ni, W., Li, W., Zhang, S., Sun, S., Taketo, M.M., et al. (2016). Wnt activation protects against neomycin-induced hair cell damage in the mouse cochlea. *Cell Death Dis.* 7, e2136.

- Liu, Q., Chen, P., and Wang, J. (2014). Molecular mechanisms and potentials for differentiating inner ear stem cells into sensory hair cells. *Dev. Biol.* 390, 93–101.
- Martinez-Monedero, R., and Edge, A.S.B. (2007). Stem cells for the replacement of inner ear neurons and hair cells. *Int. J. Dev. Biol.* 51, 655–661.
- Masuda, M., Pak, K., Chavez, E., and Ryan, A.F. (2012). TFE2 and GATA3 enhance induction of POU4F3 and myosin VIIa positive cells in nonsensory cochlear epithelium by ATOH1. *Dev. Biol.* 372, 68–80.
- Matsuoka, A.J., Morrissey, Z.D., Zhang, C., Homma, K., Belmadani, A., Miller, C.A., Chadly, D.M., Kobayashi, S., Edelbrock, A.N., Tanaka-Matakatsu, M., et al. (2017). Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells Toward Placode-Derived Spiral Ganglion-Like Sensory Neurons. *Stem Cells Transl Med* 6, 923–936.
- Mittal, R., Debs, L.H., Nguyen, D., Patel, A.P., Grati, M., Mittal, J., Yan, D., Eshraghi, A.A., and Liu, X.Z. (2016). Signaling in the Auditory System: Implications in Hair Cell Regeneration and Hearing Function. *J Cell Physiol.*
- Murugasu, E. (2005). Recent advances in the treatment of sensorineural deafness. *Ann. Acad. Med. Singapore* 34, 313–321.
- Nakajima, Y. (2015). Signaling regulating inner ear development: cell fate determination, patterning, morphogenesis, and defects. *Congenit Anom Kyoto* 55, 17–25.
- Ohyama, T., Mohamed, O.A., Taketo, M.M., Dufort, D., and Groves, A.K. (2006). Wnt signals mediate a fate decision between otic placode and epidermis. *Dev. Camb. Engl.* 133, 865–875.
- Oshima, K., Shin, K., Diensthuber, M., Peng, A.W., Ricci, A.J., and Heller, S. (2010). Mechanosensitive Hair Cell-like Cells from Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell* 141, 704–716.
- Ronaghi, M., Nasr, M., Ealy, M., Durruthy-Durruthy, R., Waldhaus, J., Diaz, G.H., Joubert, L.M., Oshima, K., and Heller, S. (2014). Inner ear hair cell-like cells from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 23, 1275–1284.
- Rost, S., Bach, E., Neuner, C., Nanda, I., Dysek, S., Bittner, R.E., Keller, A., Bartsch, O., Mlynski, R., Haaf, T., et al. (2014). Novel form of X-linked nonsyndromic hearing loss with cochlear malformation caused by a mutation in the type IV collagen gene COL4A6. *Eur. J. Hum. Genet.* 22, 208.
- Ryals, B.M., and Rubel, E.W. (1988). Hair cell regeneration after acoustic trauma in adult Coturnix quail. *Science* 240, 1774–1776.
- Sahly, I., El-Amraoui, A., Abitbol, M., Petit, C., and Dufier, J.L. (1997). Expression of myosin VIIA during mouse embryogenesis. *Anat. Embryol. (Berl.)* 196, 159–170.
- Sekerková, G., Zheng, L., Loomis, P.A., Mugnaini, E., and Bartles, J.R. (2006). Espins and the actin cytoskeleton of hair cell stereocilia and sensory cell microvilli. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 63, 2329–2341.
- Shi, F., Kempfle, J.S., and Edge, A.S.B. (2012). Wnt-Responsive Lgr5-Expressing Stem Cells Are Hair Cell Progenitors in the Cochlea. *J. Neurosci.* 32, 9639–9648.
- Shi, F., Hu, L., and Edge, A.S.B. (2013). Generation of hair cells in neonatal mice by β -catenin overexpression in Lgr5-positive cochlear progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 13851–13856.

- Shi, F., Hu, L., Jacques, B.E., Mulvaney, J.F., Dabdoub, A., and Edge, A.S.B. (2014). β -Catenin Is Required for Hair-Cell Differentiation in the Cochlea. *J. Neurosci.* *34*, 6470–6479.
- Sivakumaran, T.A., Resendes, B.L., Robertson, N.G., Giersch, A.B.S., and Morton, C.C. (2006). Characterization of an Abundant COL9A1 Transcript in the Cochlea with a Novel 3' UTR: Expression Studies and Detection of miRNA Target Sequence. *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* *7*, 160–172.
- Suzuki, N., Asamura, K., Kikuchi, Y., Takumi, Y., Abe, S., Imamura, Y., Hayashi, T., Aszodi, A., Fässler, R., and Usami, S. (2005). Type IX collagen knock-out mouse shows progressive hearing loss. *Neurosci. Res.* *51*, 293–298.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* *131*, 861–872.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* *282*, 1145–1147.
- Usami, S., Takumi, Y., Suzuki, N., Oguchi, T., Oshima, A., Suzuki, H., Kitoh, R., Abe, S., Sasaki, A., and Matsubara, A. (2008). The localization of proteins encoded by CRYM, KIAA1199, UBA52, COL9A3, and COL9A1, genes highly expressed in the cochlea. *Neuroscience* *154*, 22–28.
- Whitfield, T.T. (2015). Development of the inner ear. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *32*, 112–118.
- Wright, T.J. (2003). Fgf3 and Fgf10 are required for mouse otic placode induction. *Development* *130*, 3379–3390.
- Wu, D.K., and Kelley, M.W. (2012). Molecular Mechanisms of Inner Ear Development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*, a008409–a008409.
- Xiang, M., Gan, L., Li, D., Chen, Z.-Y., Zhou, L., O'Malley, B.W., Klein, W., and Nathans, J. (1997). Essential role of POU-domain factor Brn-3c in auditory and vestibular hair cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 9445–9450.
- Zelarayan, L.C., Vendrell, V., Alvarez, Y., Domínguez-Frutos, E., Theil, T., Alonso, M.T., Maconochie, M., and Schimmang, T. (2007). Differential requirements for FGF3, FGF8 and FGF10 during inner ear development. *Dev. Biol.* *308*, 379–391.
- Zheng, J. (1999). Immunocytochemical and Morphological Evidence for Intracellular Self-Repair as an Important Contributor to Mammalian Hair Cell Recovery.
- Zine, A. (2003). Molecular mechanisms that regulate auditory hair-cell differentiation in the mammalian cochlea. *Mol. Neurobiol.* *27*, 223–237.

FIGURE LEGENDES

Figure. 1: FGF3 and FGF10 treatment associated to dual inhibition of TGFβ and WNT enhances differentiation of hiPSCs into otic lineage cells. (A) Overview protocol for deriving otic cells from undifferentiated ChiPSC-4 cell line from d0 to d6. (B,C) Quantitative RT-PCR gene expression data from all tested conditions, we observed a significant upregulation of NNE/PPE and OP genes markers in FSBD-treated cells, which was the best condition to derive otic cells from hiPSCs. This was confirmed by immunostaining: (D-G'') PAX2, DLX5 and GATA3 were largely expressed at day 6, and a subset of differentiated cells expressed both DLX5 and GATA3 markers (E'',G''). Statistically significant differences between groups are indicated by * $p < 0.05$, and ** $p < 0.01$, (n=3). Scale bar = 100 μm. Abbreviations: **FGF**, fibroblast growth factor; **TGFβ**, transforming growth factor; **SB**, TGFβ pathway inhibitor; **Dkk1**, Dickkopf-related protein 1, Wnt pathway inhibitor.

Figure. 2: Wnt activation between d6 and d13 strongly induces otic differentiation. (A) Schematic summary of the stepwise treatment with bright-field view of generated cells after 6 and 13 days *in vitro*. (B,C) At day13, cells maintained the expression NNE/PPE and OP genes markers after Wnt activation, when compared to day 6. Quantitative analysis of PAX2 immunopositive cells (shown in E',F') revealed that more than half the cells lost the expression of PAX2 after Wnt activation: we detected PAX2 in only 20% of cells at d13 vs 55% at d6 (D). (G) Read counts from RNAseq analysis show the kinetic of gene markers during otic induction of hiPSCs: pluripotency markers markedly drop over time. Statistically significant differences between groups are indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.0001$ (n=4 and n=3 for D). Scale bar = 200 μm (A) and 100 μm (E-F''). **FGF**, fibroblast growth factor; **TGFβ**, transforming growth factor; **SB**, TGFβ pathway inhibitor; **Dkk1**, Dickkopf-related protein 1, Wnt pathway inhibitor. **Wnt3a**, Wnt activator

Figure. 3: Fluidigm Gene profiling of d13 cells generated using different treatments indicates better otic induction with WNT activation from day 6. Quantitative gene expression of NNE/PPE and OP markers (A,B) under FGF3/10 treatment alone, or (A',B') upon FGF3/10 associated to Wnt3a treatment from d6 to d13. In both conditions, we noticed an upregulation NNE/PPE and OP gene makers. However, their expression was more abundant in

the last condition, represented in (A'',B''), when the cells were treated with FGF3/10 combined to SB + Dkk1 (from d1-d6), (n=4). Abbreviations: **FGF**, fibroblast growth factor; **TGFβ**, transforming growth factor; **SB**, TGFβ pathway inhibitor; **Dkk1**, Dickkopf-related protein 1, Wnt pathway inhibitor. **Wnt3a**, Wnt activator; **NNE**, non-neural ectoderm; **PPE**, pre-placodal ectoderm; **OP**, otic placode.

Figure. 4: hiPSC-derived otic cells initiate expression of late otic markers after Wnt activation from d6. (A-D) POU4F3 and MYO7A immunostaining on cells generated using FSBD treatment from d6, (A'-D') followed by FGF3/10 and Wnt3a (d6-d13). Cells started expressing POU4F3 (shown in green) and MYO7A (shown in red) from day 6. Additionally, hiPSC-derived otic cells expressed embryonic and mature gene markers as demonstrated by qPCR (E,F). Their expression was significantly more important in day 13 when compared to day 6. Statistically significant differences between groups are indicated by *p< 0.05, **p < 0.01, and ***p < 0.0001 (n=4). Abbreviations: **FGF**, fibroblast growth factor; **TGFβ**, transforming growth factor; **SB**, TGFβ pathway inhibitor; **Dkk1**, Dickkopf-related protein 1, Wnt pathway inhibitor. **Wnt3a**, Wnt activator. **FSBD**, FGF3/10 + SB + Dkk1 treatment.

Figure. 5: Expression of otic markers analyzed by RNAseq. Graphs show read numbers for early and late otic markers in differentiated cells at d0, d6 and d13. We noticed increased expression of otic genes, some varying over a thousand fold.

Figure. 6: Comparative of late otic markers expression. Comparative analysis of embryonic HC gene markers (A) and mature HC gene markers (B) upregulation of HC marker mainly in the presence and in the absence of Wnt3a treatment, No significant differences were seen between these two conditions. Statistically significant differences between groups are indicated by *p< 0.05 (n=3). Abbreviations: **FGF**, fibroblast growth factor; **TGFβ**, transforming growth factor beta; **SB**, TGFβ pathway inhibitor; **Dkk1**, Dickkopf-related protein 1, Wnt pathway inhibitor. **Wnt3a**, Wnt activator. **HC**, hair cell.

Supplementary Figure. 7: Our induction protocol can be reproduced on a new ASC iPSC cell line. To evaluate the efficiency of our induction protocol, we tested the effect of FSBD treatment on the otic differentiation using another hiPSC line. (A, B') When we quantified gene expression of the same NNE/PPE and OP genes markers, we observed upregulation of otic

markers comparable to our results with the ChiPSC-4 cell line. (C, E'') Some of these markers were also detected with immunostaining: obtained progenitors were positive for GATA3, DLX5 and PAX2, as demonstrated with the ChiPSC-4 cell line. Statistically significant differences between groups are indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.0001$ (n=5). Abbreviations: **FGF**, fibroblast growth factor; **TGF β** , transforming growth factor; **SB**, TGF β pathway inhibitor; **Dkk1**, Dickkopf-related protein 1, **FSBD**, FGF3/10 + SB + Dkk1 treatment; **NNE**, non-neural ectoderm; **PPE**, pre-placodal ectoderm; **OP**, otic placode.

Supplementary Figure. 8: Next generation sequencing data of expressed gene in hiPSC-derived otic cells. (A) We identified 899 differentially-expressed transcripts at d0 vs d6, and 1272 at d0 vs d13. Between d6 and d13 (i.e. during WNT activation), 339 were upregulated and 309 were downregulated. (B) Among the upregulated transcripts, 15 were common with our preselected genes quantified with Fluidigm.

Supplementary Figure. 9: Wnt activation promotes expression of some collagen gene markers. At day 13, after Wnt activation, we observed up regulation of some collagen gene markers when compared to day 6.

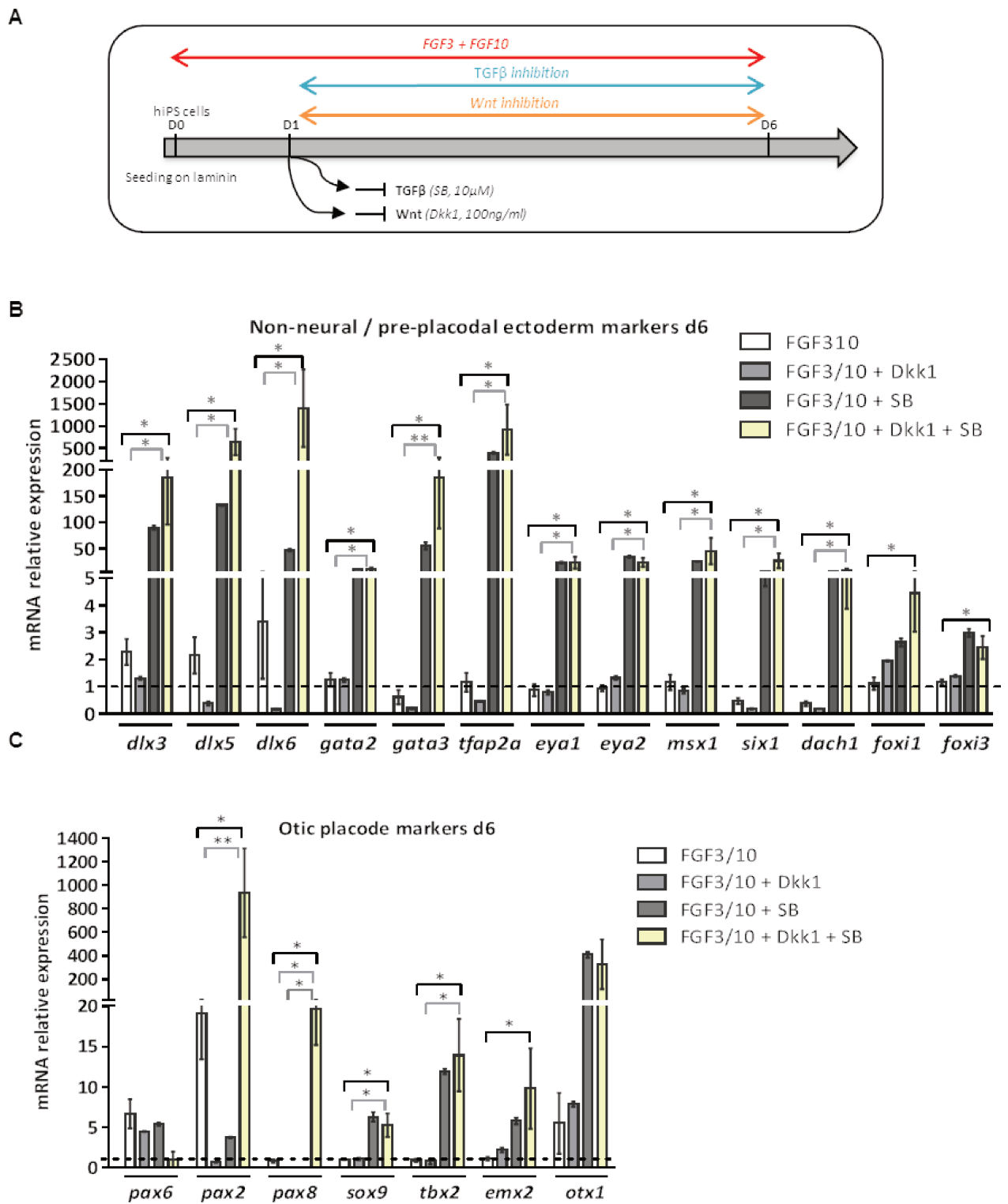


Figure 1 (Lahlou et al., 2017)

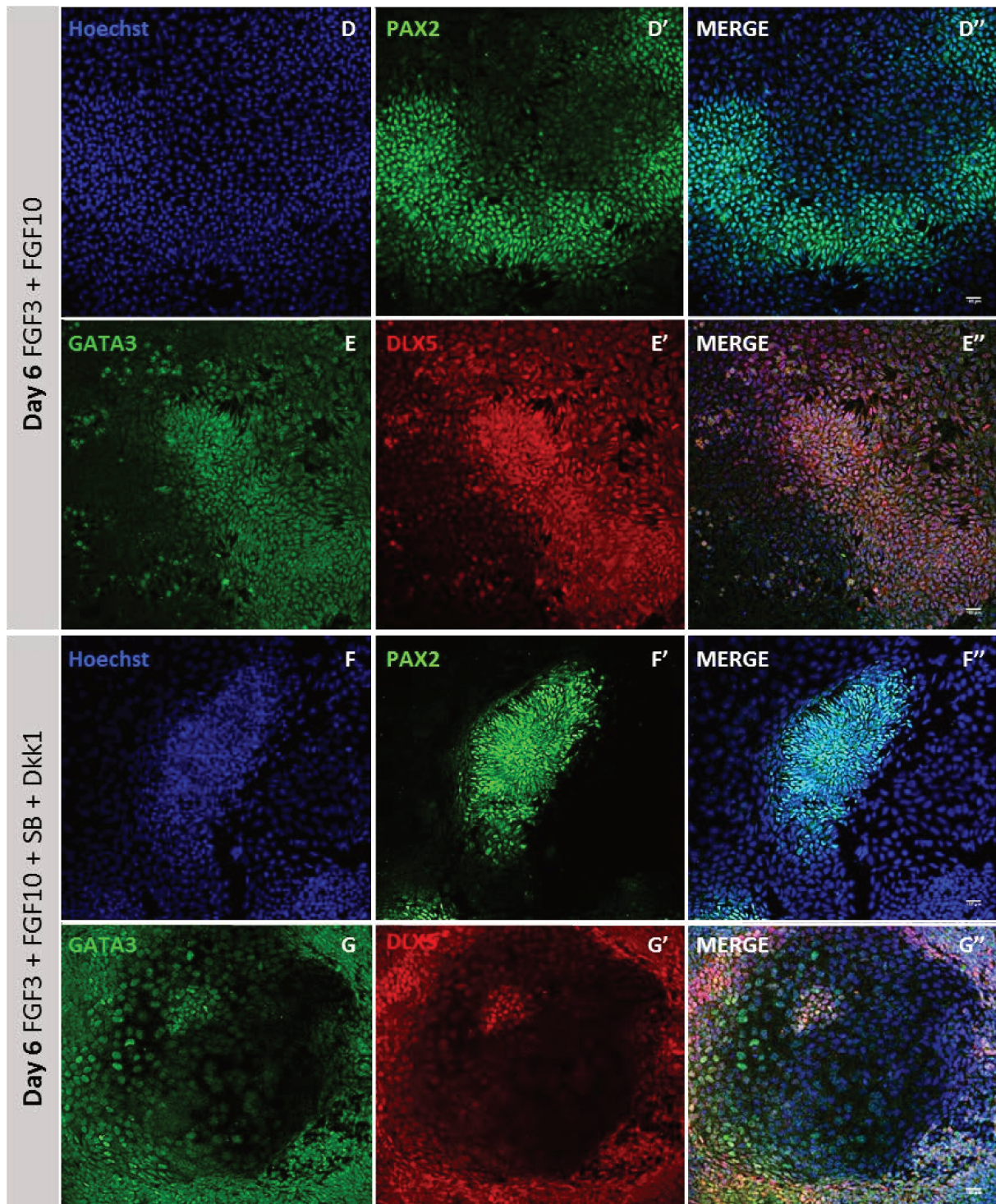
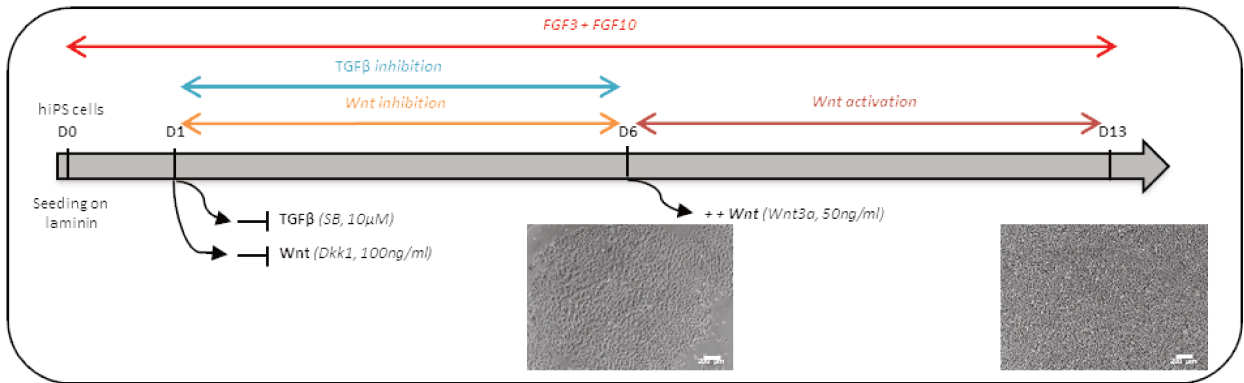
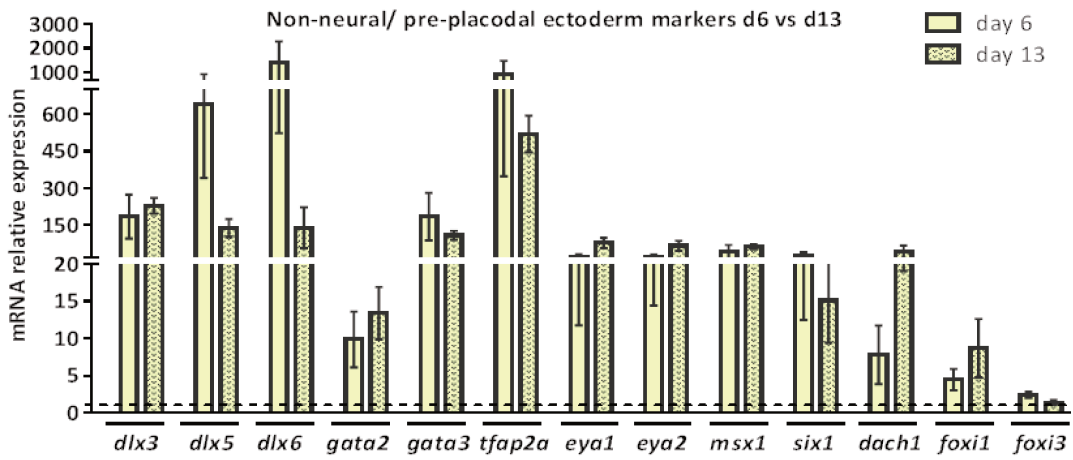


Figure. 1 (Lahlou et al., 2017)

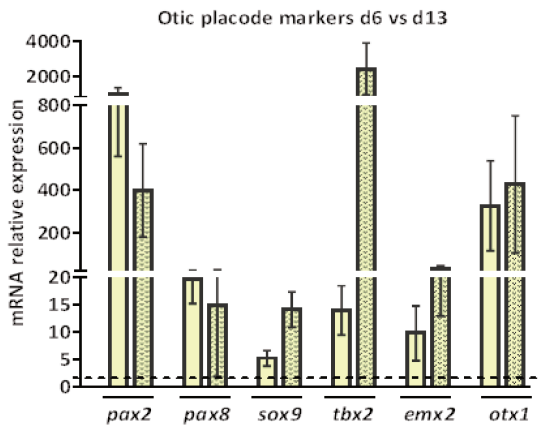
A



B



C



D

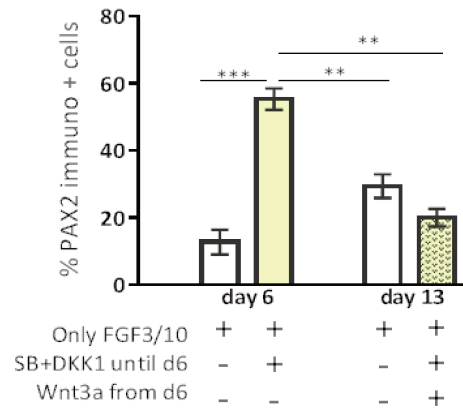


Figure. 2 (Lahlou et al., 2017)

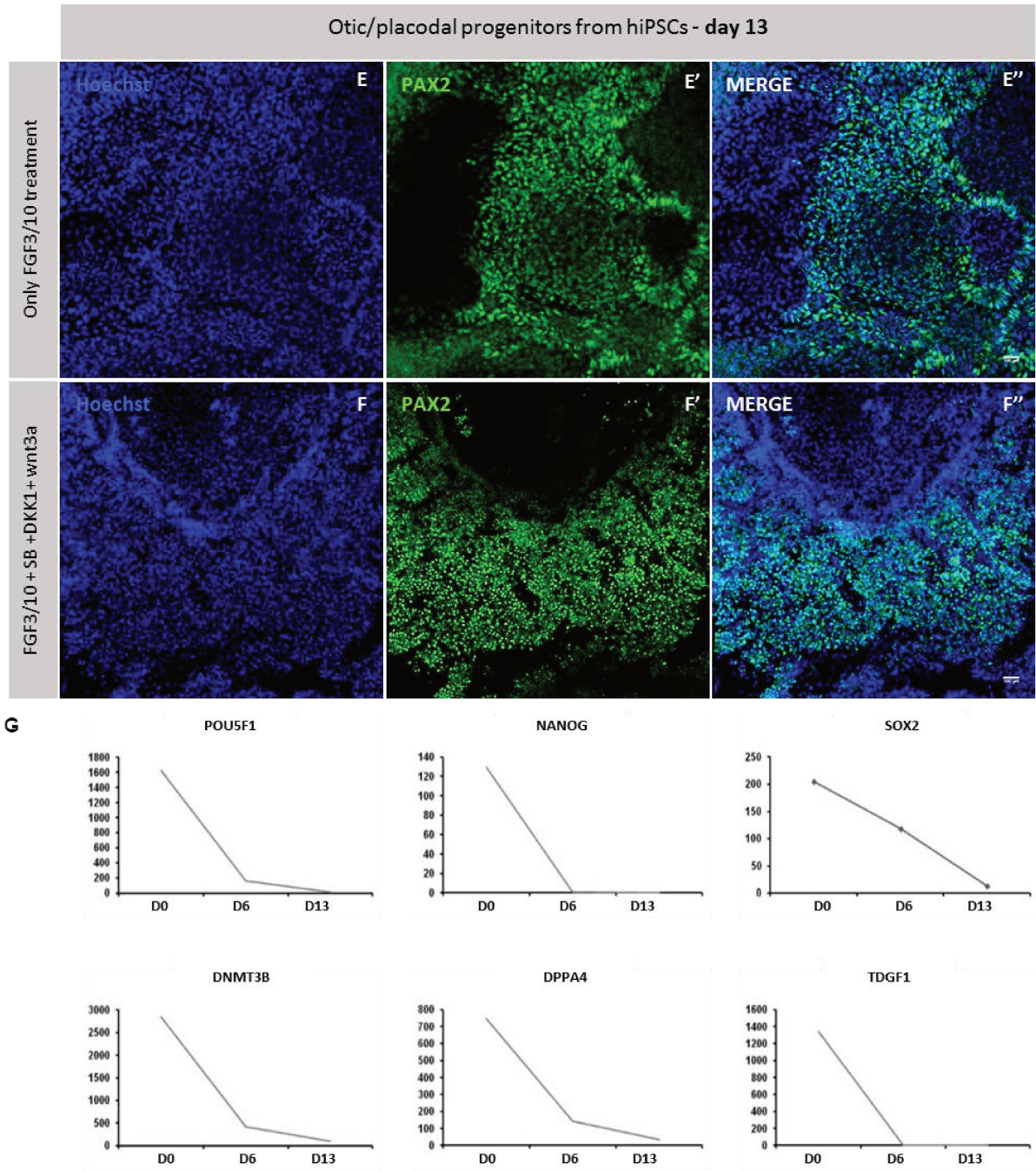


Figure. 2 (Lahlou et al., 2017)

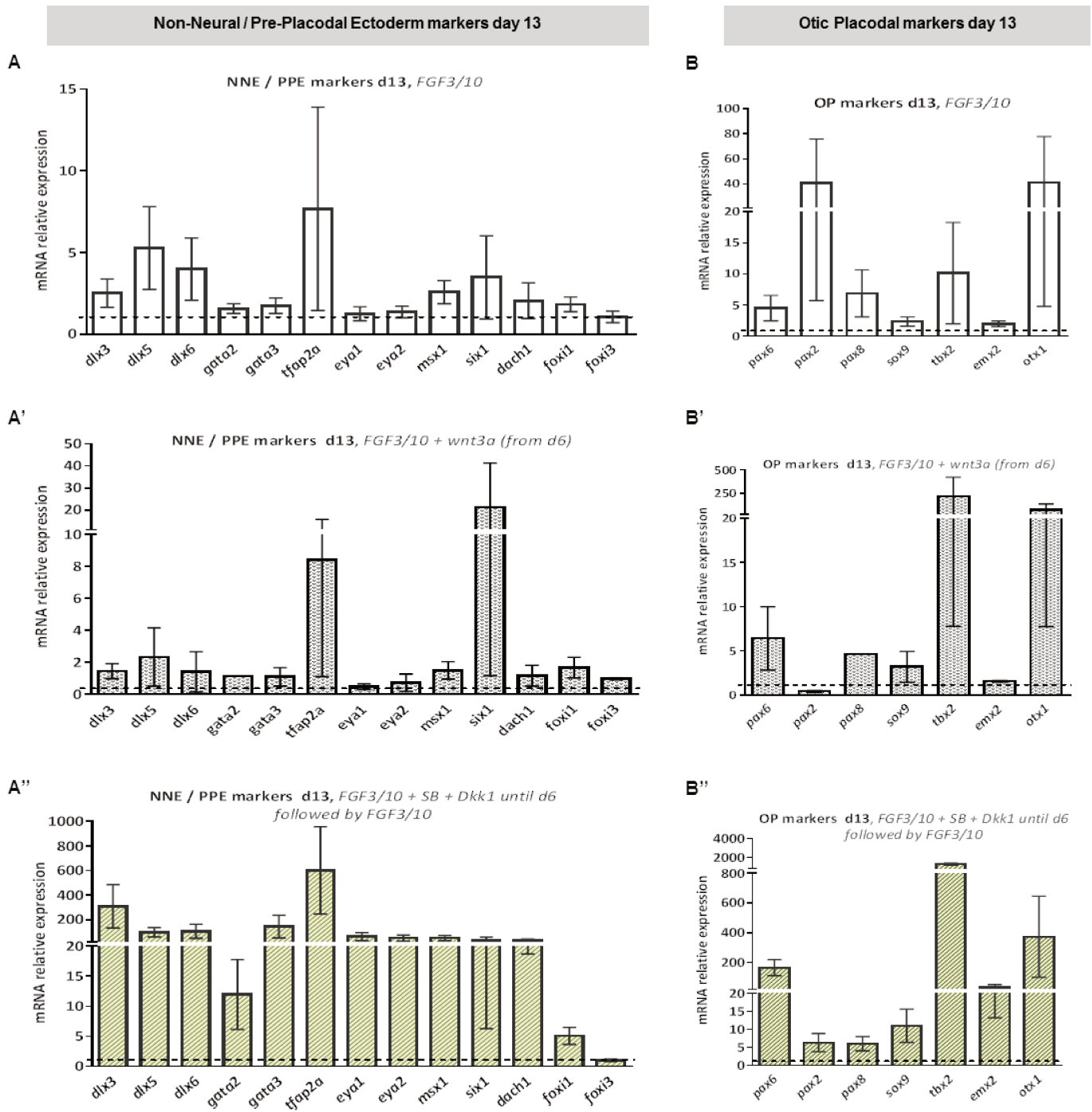


Figure. 3 (Lahlou et al., 2017)

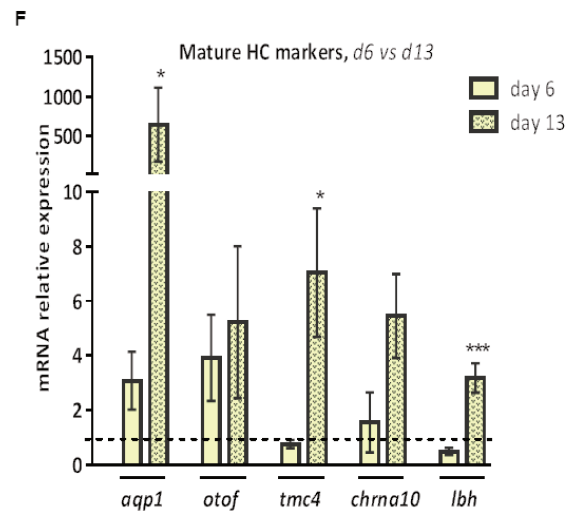
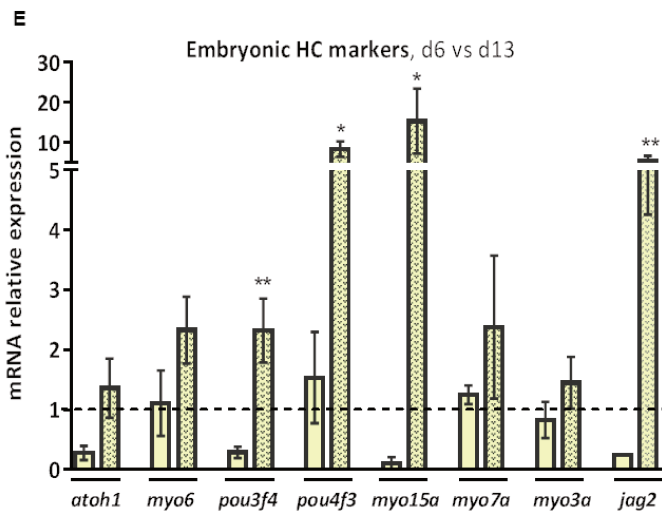
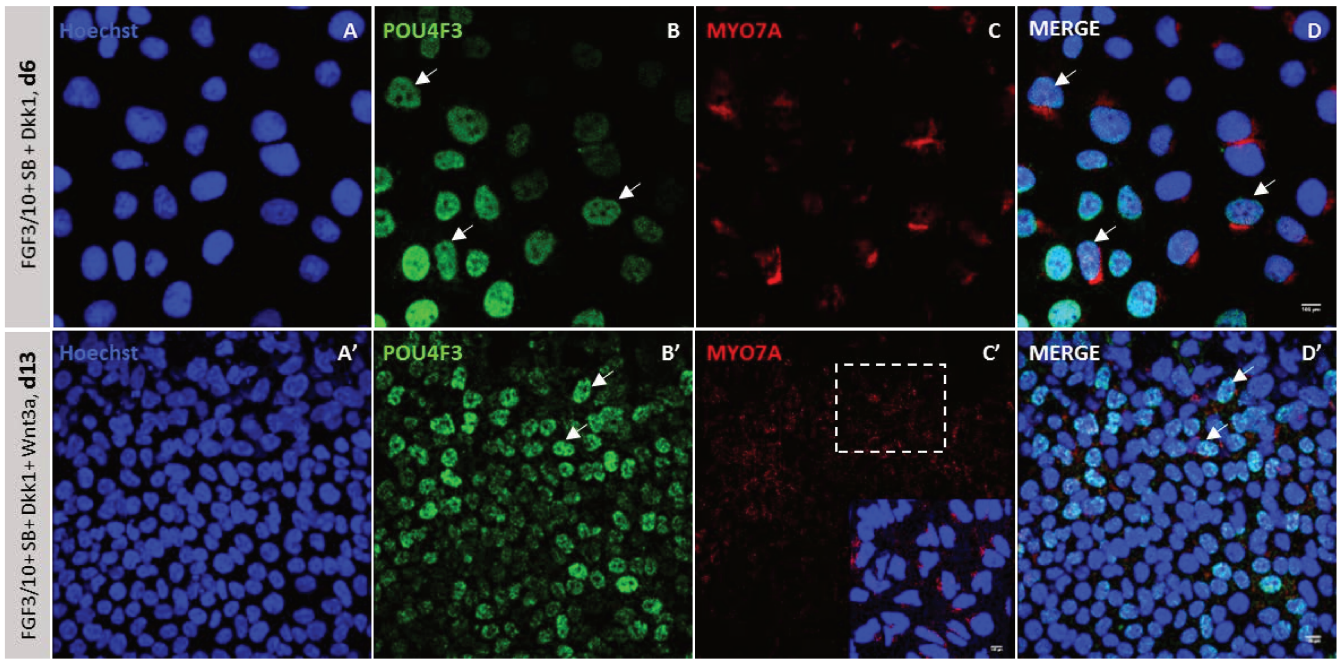


Figure. 4 (Lahlou et al., 2017)

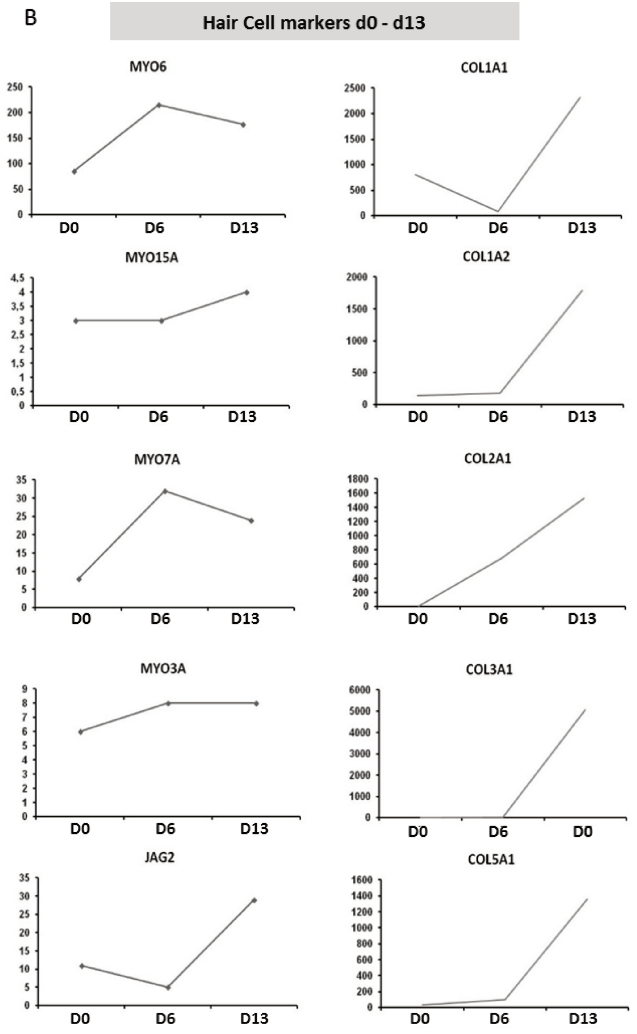
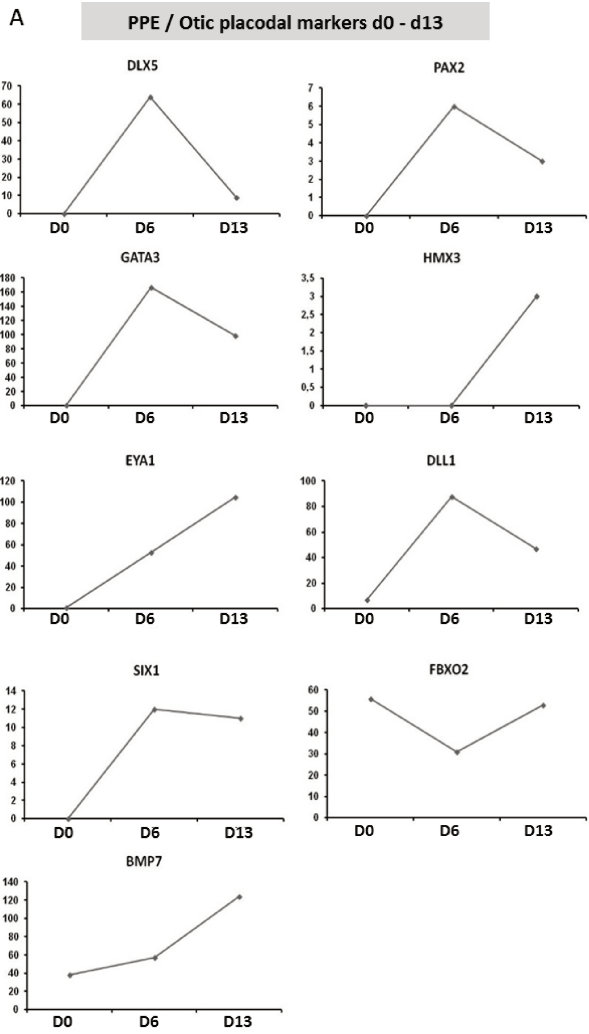
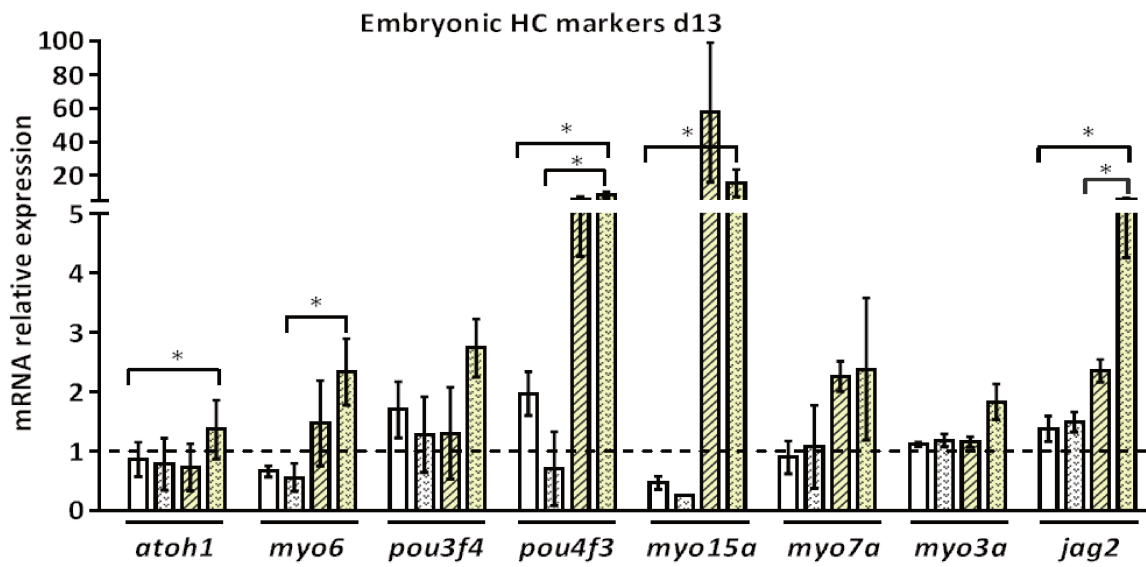


Figure. 5 (Lahlou et al., 2017)

A



B

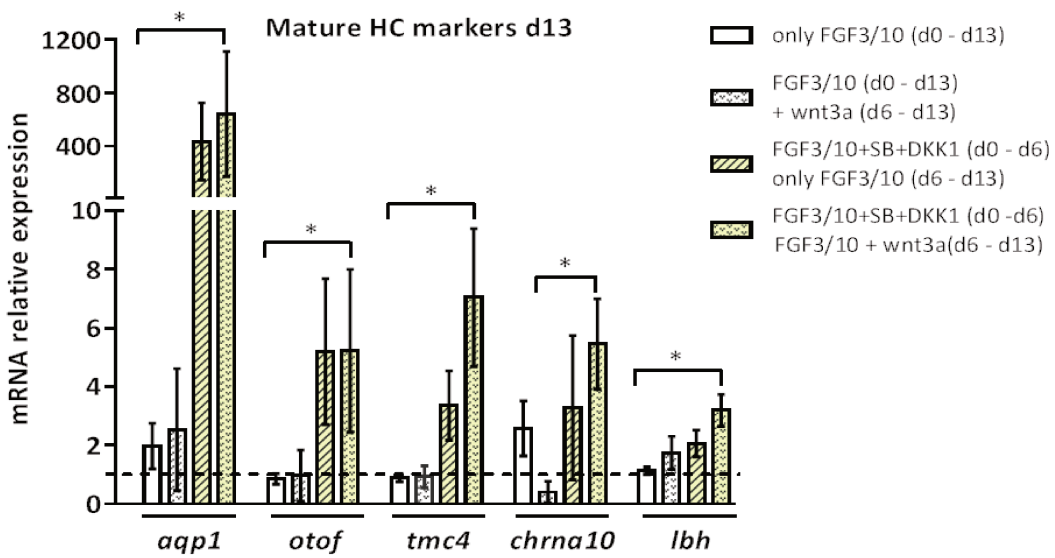
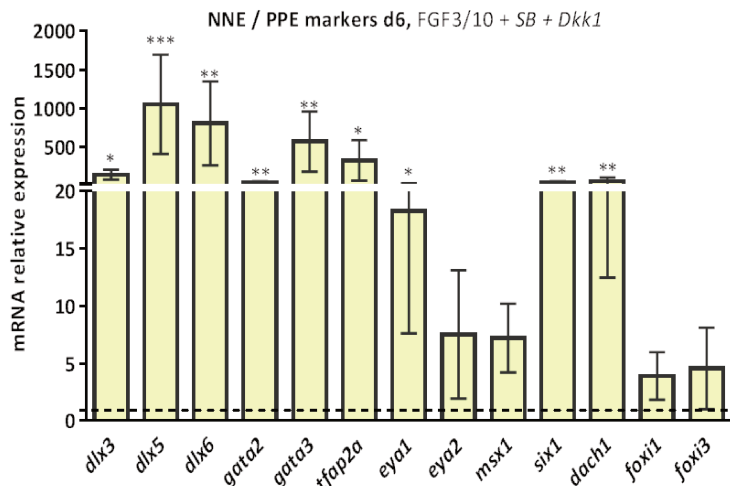
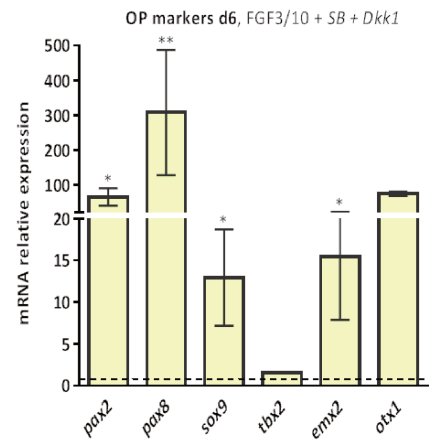


Figure. (6 Lahlou et al., 2017)

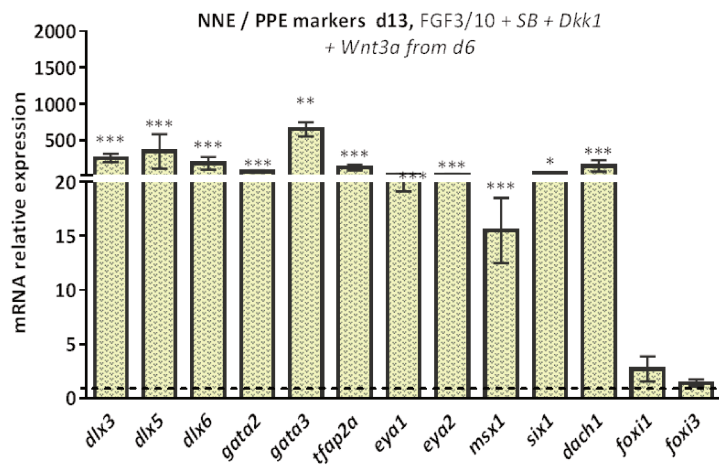
A



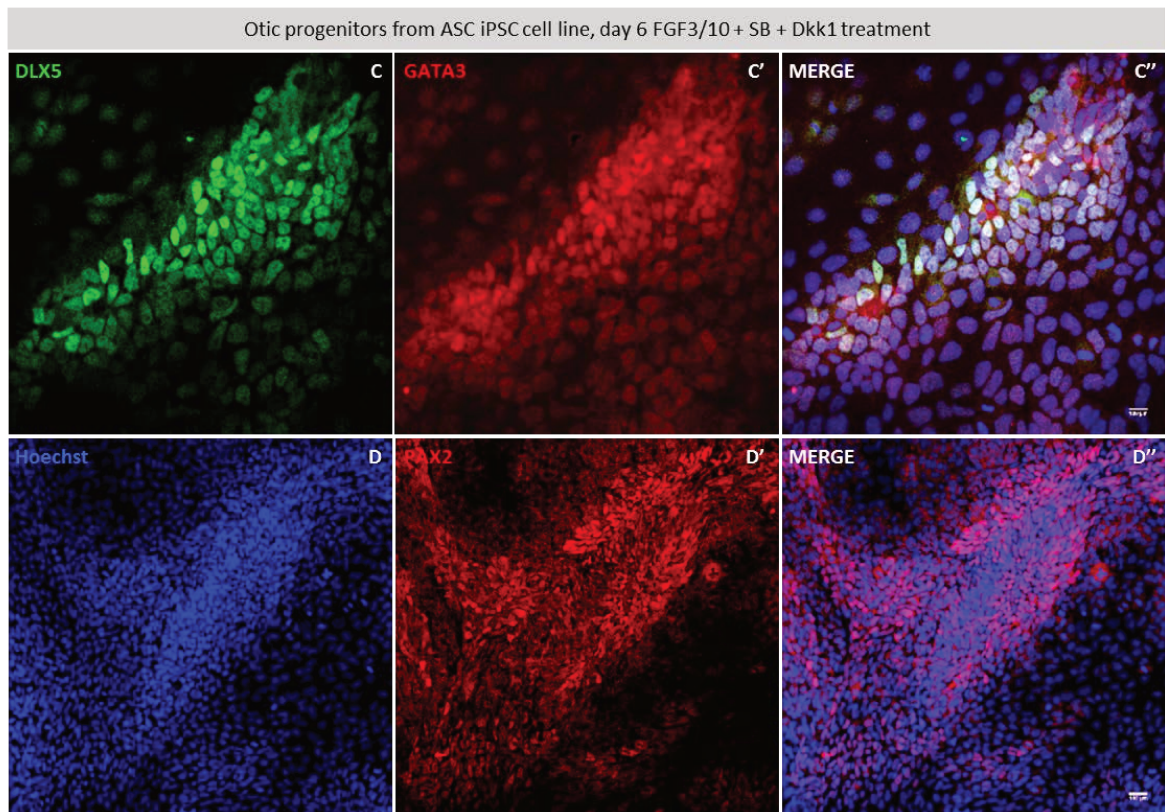
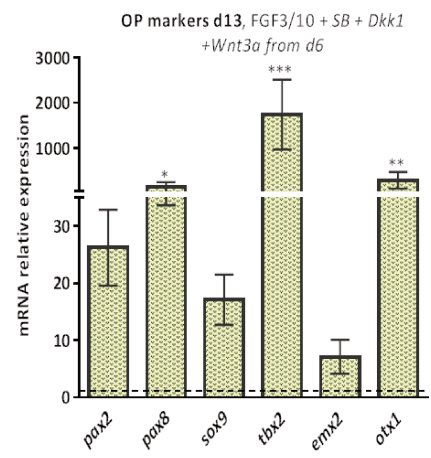
A'



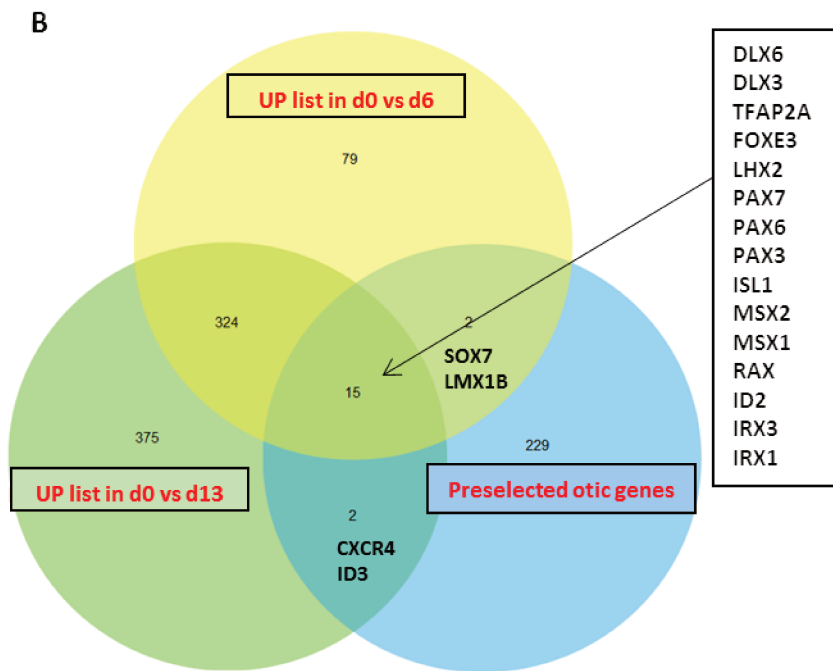
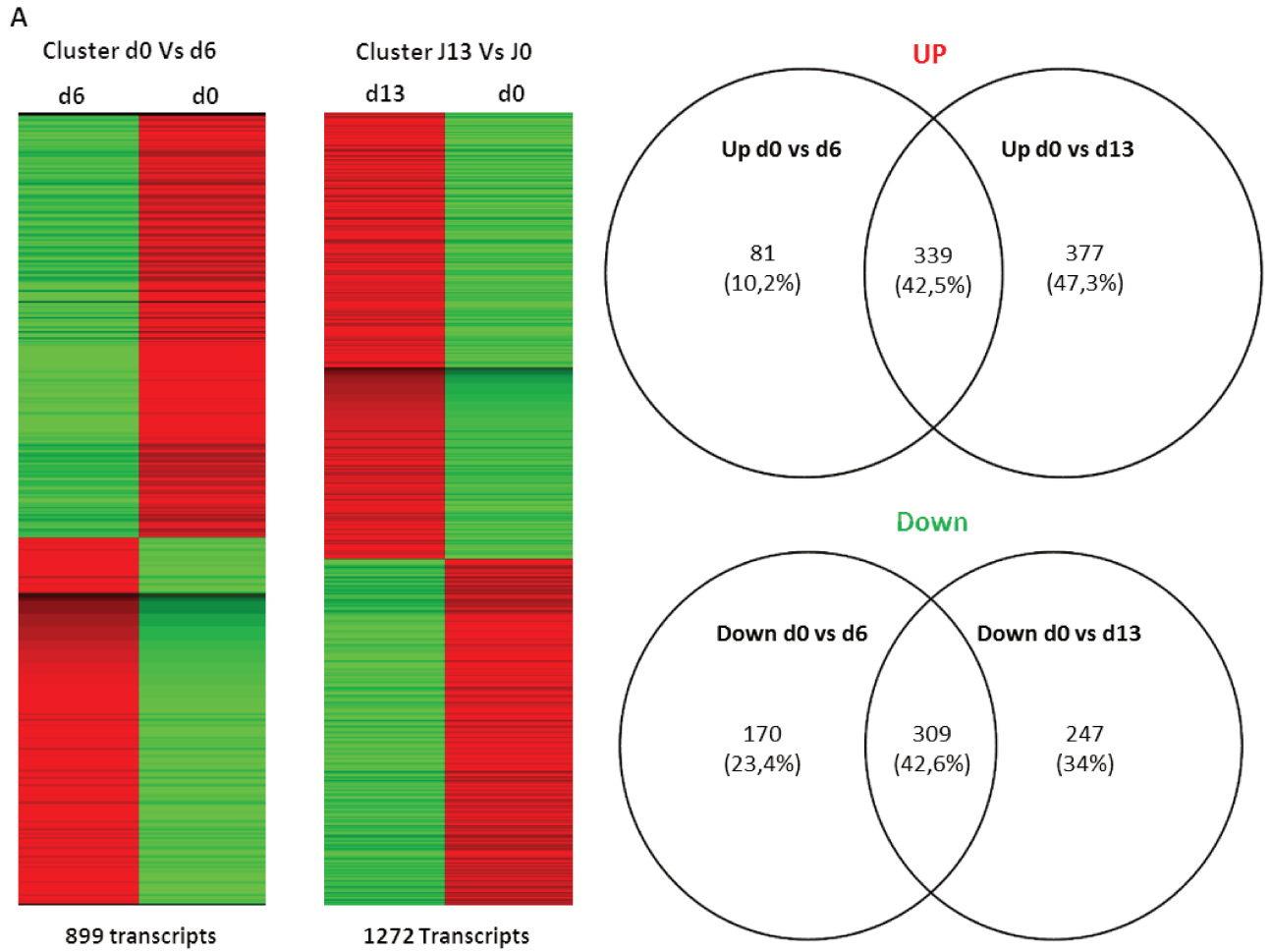
B



B'

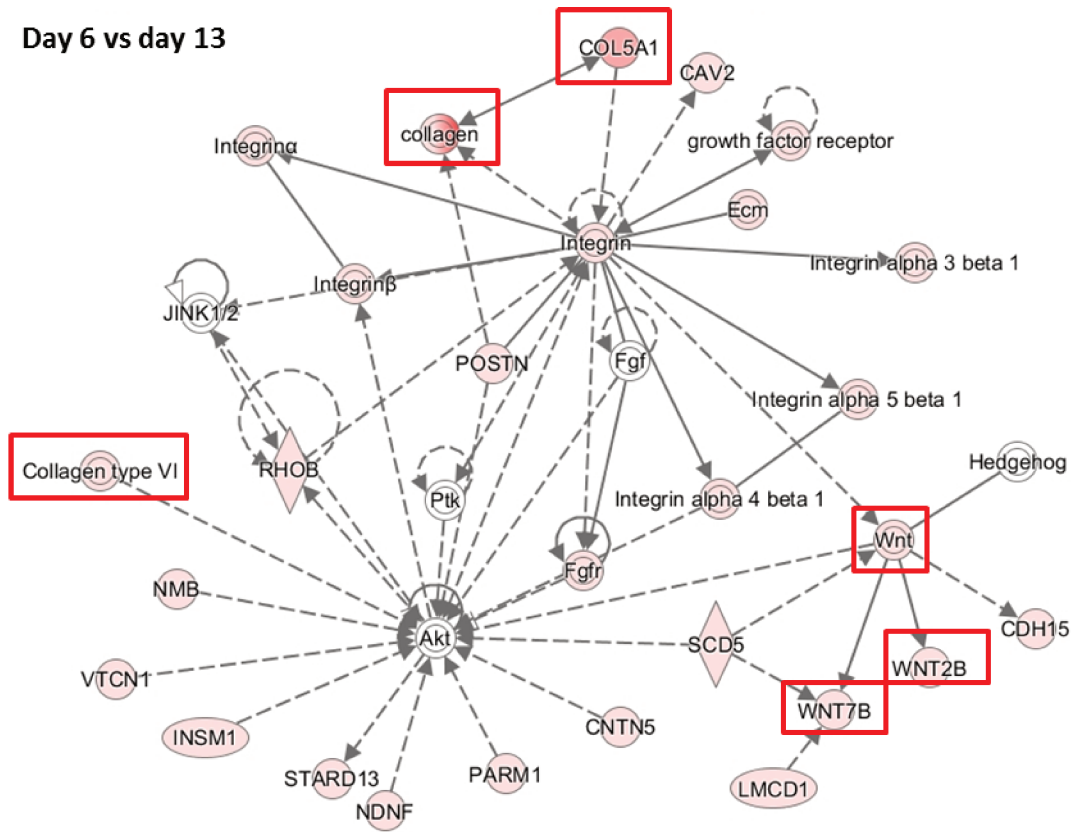


Supplementary Figure. 7 (Lahlou et al., 2017)



Supplementary Figure. 8 (Lahlou et al., 2017)

Day 6 vs day 13



Supplementary Figure. 9 (Lahlou et al., 2017)

Gene	FP	RP
GAPDH	ACACCATGGGGAAGGTGAAG	GTGACCAGGCGCCCAATA
DACH1	GAGAAGCAGTTGGCTATGGAAC	ACGCCGTTTCGTCTCAAAC
DLX3	AGCCTCCTACCGGCAATAC	TTCCGGCTCCTCCTTCAC
DLX5	GCTAGCTCCTACCACCAGTAC	GGTTTGCCATTCACCATTCTCA
DLX6	CAGCTTCCTTAGGACTGACACA	GAGGATTACTGCCCTGCTTCA
EMX2	GCCCCATAAATCCGTTCTCA	CAAGTCCGGGTTGGAGTAGAC
EYA1	CCGCTACAGACGGGTAAAAG	TTCCCTCTTAGCTGGACCAA
EYA2	ACCAGATCCACGTTGATGAC	CGTCAGCGGAGAAGTTGTA
FOXI1	GACAAGCGCCTCACTCTCA	CCGGCCTTGCTCTTGTGTA
FOXI3	TCGCTCAACGACTGCTTCAA	GCAGTTCGGATCAAGAGTCCAA
GATA2	CAGAACCGACCACTCATCAA	CACAGGCGTTGCAGACAG
GATA3	CACGGTGCAGAGGTACCC	AGGGTAGGGATCCATGAAGCA
MSX1	CGCAGGTGAAGATATGGTTCC	CTCCAGCTCTGCCTCTTGTA
OTX1	GACCTCCTGCACCCATCC	CAGCTGTGAACGCGTGAA
PAX2	CGGCTGTGTCAGCAAAATCC	GCTTGGAGCCACCGATCA
PAX6	TTGCCCCGAGAAAGACTAGCA	TCTCCATTTGGCCCTTCGATTA
PAX8	GCCCAGTGTGTCAGCTCCATTA	GCTGTCCATAGGGAGGTTGAA
SIX1	GGTTTAAGAACCGGAGGCAAA	TGCTTGTTGGAGGAGGAGTTA
SOX9	AACGCCGAGCTCAGCAA	CGCTTCTCGCTCTCGTTCA
TBX2	CCAACAACATCTCTGACAAGCA	TTGGCTCGCACTATGTGGAA
TFAP2A	TAAAGCTGCCAACGTTACCC	GCACACGTACCCAAAGTCC
ATOH1	GCAATGTTATCCCGTCGTTCAA	TCGGACAAGGCGTTGATGTA
AQP1	GCCATCGGCCTCTCTGTA	AAAGGACCGAGCAGGGTTAA
CHRNA10	GCGCTCACCGTCTTCC	ACCACAGTAATGCAGGTTCA
JAG2	CTGGGTGGAAGACTGCAACA	AGCAGACAAGGCTTCCATCC
LBH	ATGGAGGAGATCGGCCTCA	AAAATCTGACGGGTCTGGGAA
MYO15A	GAAACCACTGTGCTGTCAA	ACCAGGATGCTCCAATGTA
MYO3A	GGCAACTGAACACCAGATTGAC	CTGCCCGAATGCAAAGCAA
MYO6	GTGCTGGTCTTCTGAAGATA	CTAGTGACGCTCGGTTTAA
MYO7A	TGAGACCCAGTTTGGCATCA	GGTGTCTCGGTTCTTCTCCA
OTOF	CCTGCAGATCTGGGATGC	ATCTCCATGGTGCACTGCTT
POU3F4	CACCACTACCGCACACTA	TTGGCCGCTTGACGTGATA
POU4F3	CTGCAAGAACCCAAATTCTCCA	GGCTCTCATCAAAGCTTCCAAA
TMC4	CTTTACTGCCCTGCTTAACAC	AGCAGGTGGAGAAGAGGGTA

Table S1: Primer sequences used for Fluidigm assay

DISCUSSION GENERALE

Les travaux présentés dans cette thèse apportent de nouvelles connaissances sur les iPSC humaines, leur intérêt et leur efficacité dans le cadre de traitement des surdités neurosensorielles. En même temps, ces travaux soulèvent de nombreuses questions en particulier sur les voies de signalisation nécessaires pour leur différenciation en cellules progénitrices otiques ainsi que leur spécification en CC.

Rôle de la voie Notch dans la différenciation des iPSC humaines en cellules ciliées

L'étape la plus importante dans le développement de la cochlée est la spécification des cellules neurosensorielles, notamment les cellules ciliées. Au cours de ce processus, un complexe de signaux génétiques et de voies de signalisation est nécessaire pour réguler l'expression des gènes otiques et favoriser la différenciation des cellules ciliées. Dans le premier article présenté dans cette thèse, nous décrivons un nouveau protocole permettant la différenciation des iPSC humaines en cellules ciliées. Nous avons montré que, lorsqu'ils sont traités avec un inhibiteur de la voie Notch (inhibiteur de la gamma-sécrétase), les progéniteurs otiques sont capables de se différencier en cellules ciliées et expriment un ensemble de marqueurs tardifs du lignage otique : ATOH1, POU4F3 et MYO7A. Ce sont des marqueurs nécessaires à la spécification et à la maturation des CC. Atoh1 est l'un des premiers marqueurs exprimés lors du développement embryonnaire de l'oreille : chez la souris, son expression débute vers E12.5 - E13. Sa délétion entraîne une absence de cellules ciliées et sa surexpression induit la formation de cellules ciliées ectopiques (Pan et al., 2011). Ainsi, Atoh1 est-il nécessaire et, dans certains contextes, suffisant au développement précoce de l'oreille interne et à la spécification des CC (Jahan et al., 2015). En outre, ce gène interagit avec d'autres facteurs de transcription et régule l'expression de certains gènes comme Pou4f3 (Masuda et al., 2011, 2012), qui est exprimé dans nos cellules en culture (**Article I, Figure 6**). Dans notre étude, l'inhibition de Notch induit non seulement l'expression d'Atoh1 et de Pou4f3 mais aussi de Myo7a, un marqueur robuste du lignage otique (*late otic lineage*), dans 50% des cellules générées en inhibant Notch (**Article I, Figure 5E**). La myosine 7a est exprimée au niveau des stéréocils des CC externes et internes et elle joue un rôle majeur dans l'assemblage des stéréocils en touffe ciliaire et dans le maintien de leur rigidité (Hasson, 1999). Les résultats obtenus dans l'article I montrent que l'inhibition de Notch induit une expression des marqueurs tardifs du lignage otique : la présence des cellules co-exprimant à la fois Pou4f3 et Myo7a indique que ces cellules sont déjà engagées dans le phénotype de la cellule ciliée (*late otic lineage*) et suggère que l'initiation de l'expression de ces marqueurs est dirigée par Atoh1, comme déjà démontré chez la souris. (*Atoh1 E12.5, Pou4f3 E13, Myo7a E13.5, Pou4f3*

expression is initiated around embryonic day 13 (E13), just after that of Atoh1 and preceding myosin VIIa expression).

Notch pourrait induire une transdifférenciation des cellules de soutien en CC via le mécanisme de l'inhibition latérale (Kiernan, 2013), qui favorise l'expression d'*atoh1* en mépris de *hes1* et *hes5* (Zine et al., 2001). Nos résultats montrent que l'inhibition de Notch induit une diminution de l'expression des gènes *hes5* et *lfng*, effecteurs de la voie Notch (BASCH, 2016; Zine et al., 2001). Cette diminution est accompagnée d'une augmentation de l'expression d'*atoh1* (**Article I, Figure 5B-C**).

Nos résultats sont en parfaite harmonie avec les études sur le rôle de la voie Notch *in vivo / ex vivo*, puisque de nombreuses études montrent que l'inhibition de la voie Notch, avec un inhibiteur de la gamma-sécrétase, induit la régénération des cellules ciliées dans des modèles de surdité ou des explants lésés (Chonko et al., 2013b; Ren et al., 2016; Slowik and Bermingham-McDonogh, 2013; Taura et al., 2016b; Zhao et al., 2011; Zine et al., 2000). Par conséquent, elle favorise une récupération partielle de l'audition dans un modèle de trauma acoustique (Mizutari et al., 2013).

Ici, nous apportons non seulement de nouveaux arguments en faveur de l'inhibition de Notch *in vitro*, mais à notre connaissance, notre étude est la première à montrer l'effet de l'inhibition de la voie Notch sur la différenciation des iPSC humaines en CC. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que nous avons testé pour la première fois *in vitro* une molécule de grade clinique, la DBZ (*difluorobenzeneacetamid*), qui donne des résultats comparables aux autres molécules inhibant la gamma-sécrétase, comme la DAPT, L-685458, MDL28170 ou LY411575. Ce travail pourrait ainsi déboucher sur une nouvelle stratégie de différenciation des iPSC humaines en cellules ciliées, rapidement applicable en clinique.

La voie WNT est nécessaire pour initier la différenciation des cellules ciliées

La compréhension fine du développement de l'oreille interne et des mécanismes qui le sous-tendent est primordiale et nécessaire pour mieux appréhender les phénomènes impliqués dans la régénération *in vitro* des cellules cochléaires, qu'elles soient ciliées ou neuronales. Dans notre deuxième article, nous avons abordé deux pans essentiels de la différenciation des cellules souches en cellules du lignage otique : la différenciation précoce, qui donne naissance aux progéniteurs otiques exprimant des marqueurs de la placode otique (e.g. GATA3, DLX5, PAX2 et PAX8), et la différenciation tardive ou la spécification des CC, caractérisée par l'expression

des marqueurs plus matures du lignage otique (e.g. POU4F3, MYO7A, MYO15A, OTOF, AQP). Nous avons étudié l'effet d'une modulation de la voie Wnt sur la différenciation précoce et tardive des iPSC humaines en cellules otique. Dans notre premier article, nous avons montré que des iPSC humaines traitées avec FGF3 et FGF10 étaient capables de se différencier en progéniteurs otiques. Après 13 jours d'induction, nous étions capables de générer des cellules exprimant PAX2, un marqueur robuste de la placode otique (Bouchard et al., 2010; Burton et al., 2004). Ce n'est pas surprenant, puisque le FGF3 et le FGF10 jouent un rôle important dans le développement de l'oreille interne et la formation de la placode otique *in vivo* (Alvarez et al., 2003; Wright, 2003); cependant, le rendement que nous avons obtenu *in vitro* (29% de progéniteurs otiques) suite au traitement FGF3 et FGF10 reste relativement faible. Ces deux facteurs de croissance n'étaient donc pas suffisants pour induire une bonne différenciation des iPSC humaines en progéniteurs otiques. Afin d'améliorer notre protocole d'induction, en plus d'utiliser FGF3 et FGF10, nous avons d'abord inhibé les voies TGF- β (SB) et WNT (Dkk1) durant la première phase d'induction (J1 – J6), dans le but de supprimer la formation de l'endoderme et le mésoderme, et de promouvoir l'expression de l'ectoderme qui est à l'origine de l'oreille interne (Ohnishi et al., 2015; Oshima et al., 2010; Ronaghi et al., 2014). Ensuite, les cellules ont été traitées avec un activateur de la voie Wnt (Wnt3a) à partir de J6 jusqu'à J13. Pour évaluer l'efficacité de notre nouveau protocole, nous avons exploré l'expression d'un panel de marqueurs otiques en Fluidigm et immunocytochimie à différents temps. Nos résultats montrent que l'association de FGF3 et FGF10 avec la double inhibition de TGF- β et WNT (traitement FSBD) induit une meilleure différenciation des iPSC humaines en progéniteurs otiques. Nous avons observé une forte expression des marqueurs de la région pré-placodale DLX3/5/6, GATA2/3, TFAP2A, EYA/2, MSX2, SIX1, DACH1, FOXI1 et FOXI3, ainsi que des marqueurs de la placode otique, notamment PAX2/8, SOX9, TBX2, EMX2 et OTX (**Article II, Figures 1-2**). Avec le traitement FSBD, à J6, 55% de cellules différenciées sont déjà positives pour PAX2, contre seulement 13% avec le traitement FGF3 et FGF10. Nous étions encore plus surpris de voir que nos cellules commençaient à exprimer certains marqueurs tardifs du lignage otique dès le jour 6, notamment POU4F3 et MYO7A. L'expression de ces marqueurs était significativement plus importante à J13 et accompagnée d'une apparition d'autres marqueurs de CC embryonnaires (MYO6A, POU3F4, MYO15A et JAG2) et matures (e.g. AQP1, OTOF, TMC4, CHRNA10 and LBH) (**Article II, Figure 4**). De plus, l'expression de certains de ces marqueurs a été confirmée par l'analyse transcriptomique (**Article II, Figures 5**).

En résumé, l'ensemble de nos résultats indique que l'inhibition de TGF- β et WNT est nécessaire pour l'induction otique durant la première phase de différenciation : l'action combinée de FGF3 et FGF10 associée à une double inhibition TGF- β et WNT augmente le taux de différenciation des iPSC humaines en progéniteurs otiques et initie l'expression des marqueurs de la CC, cela correspond à ce qui était attendu. En effet, plusieurs études avaient déjà montré l'importance de ces deux voies de signalisation dans la différenciation otique *in vitro* à partir de cellules souches embryonnaires et adultes avec différentes méthodes de culture : différenciation des hiPSC/hESC en monocouche (Ealy et al., 2016), différenciation en 2D à partir des hESC (Ronaghi et al., 2014), différenciation en 3D à partir d'iPSC et d'ESC murines (DeJonge et al., 2016; Koehler et al., 2013), ou encore à partir d'iPSC humaines (Koehler et al., 2017). Cependant, dans ces études, aucune n'avait montré des marqueurs de CC apparaissant à J6, ils n'étaient visibles qu'après de longues durées de différenciation allant de 42 jusqu'à 150 jours *in vitro*. Qui plus est, le rendement de différenciation que nous avons obtenu, à savoir 55% de cellules PAX2 positive en seulement 6 jours d'induction, est assez important, puisque dans les autres études ce rendement n'atteignait 30% qu'en 12 jours à partir d'ESC (Chen et al., 2012), ou encore 28.9 % qu'après 18 jours *in vitro* en utilisant des iPSC humaines (Ealy et al., 2016).

Par ailleurs, nous n'avons décelé aucun effet de l'activation de Wnt sur l'expression des marqueurs tardifs, puisqu'ils étaient présents même en absence de Wnt3a, dans des cellules traitées uniquement avec FGF3 et FGF10 de J6 à J13 (**Figure 5, Article II**). L'activation tardive de la voie Wnt ne semble pas avoir un effet sur la spécification et la différenciation des CC. Moduler la voie Wnt n'est donc plus utile au-delà de J6. Nos résultats sont différents de ceux obtenus par Koehler et DeJonge, qui ont montré qu'une activation de la voie Wnt pendant 48h à partir de J8, avec une molécule différente de la nôtre (CHIR99021), induisait une différenciation des CC à partir d'ESC murines (DeJonge et al., 2016) ou d'iPSC humaines (Koehler et al., 2017). Cependant, malgré qu'ils aient examinés l'effet de l'activation de Wnt à différents temps (6, 8, 9, 10 et 11 jours), ils n'ont observé aucune expression des marqueurs de la CC. Ainsi, notre protocole semble être plus efficace, l'apparition des marqueurs embryonnaires et adultes de la CC à J13 dans notre modèle pourrait être expliquée par un effet durable de l'inhibition de la voie Wnt durant la première phase de différenciation, puisque en absence de l'activation de Wnt, nous observons le même profil d'expression des marqueurs tardifs du lignage otique (**Article II, Figure 6**). Des expériences supplémentaires sont toutefois nécessaires pour confirmer ou infirmer cette hypothèse : il serait intéressant de voir l'effet de

la molécule utilisée par Koehler et DeJone sur notre modèle, ou encore tester d'autres concentrations à différents temps pour mieux déceler si une activation tardive de la voie Wnt renforce la différenciation et la spécification des CC.

Nous étions curieux de voir ce que deviennent les cellules si on les maintient plus longtemps en culture et de déterminer dans quel milieu il faut les garder. Pour répondre à ces questions, nous avons maintenu les progéniteurs otiques obtenus à J13 dans un milieu DFNB seul, ou supplémenté avec de l'acide rétinoïque (AR) et de l'EGF (*epidermal growth factor*) pendant 2 semaines. Ensuite, nous avons examiné le devenir des cellules par qPCR, en regardant l'expression des marqueurs retrouvés à J13 et d'autres marqueurs de CC mature. Présentés dans la **figure 13**, nos résultats montrent que les cellules maintiennent l'expression des mêmes marqueurs qu'à J13. Curieusement, le gène ESPN (espine), marqueur de CC mature exprimé au niveau des stéréocils, est fortement exprimé à J27, ce qui suggère que certaines cellules acquièrent une maturité avancée et le phénotype de cellule ciliée. Afin de confirmer ces résultats, nous avons étudié l'expression de ce marqueur par immunocytochimie mais malheureusement les résultats n'étaient pas concluants. D'autres études avec de meilleurs anticorps pourraient être poursuivies.

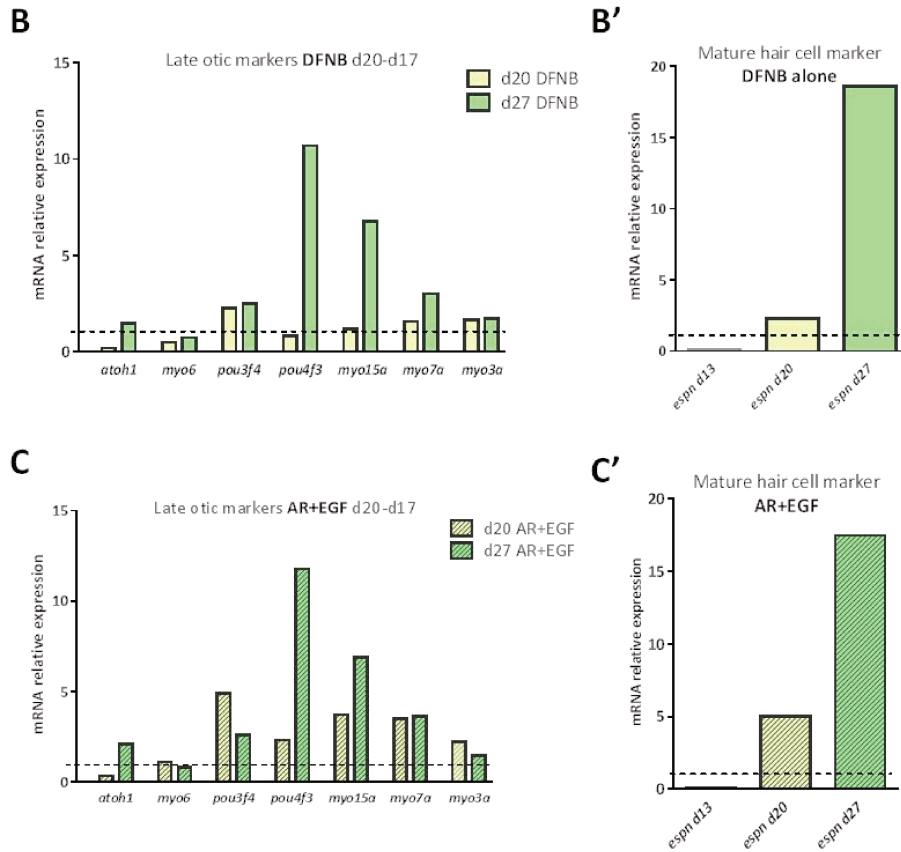
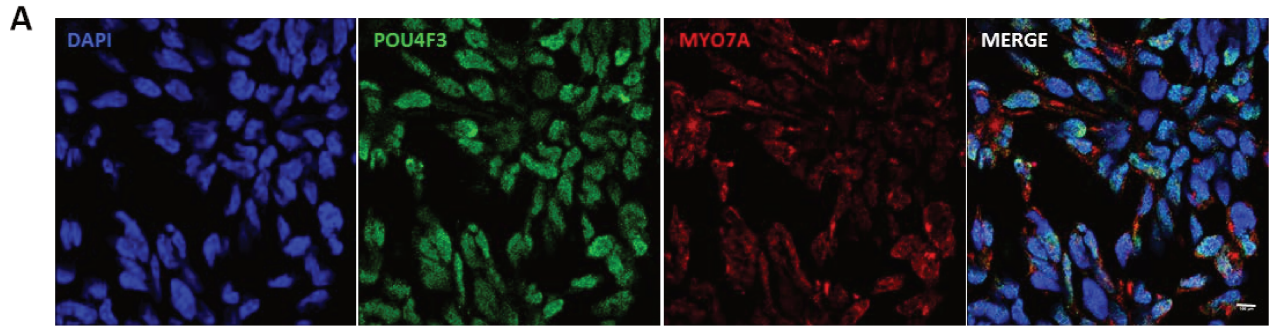


Figure 13: Caractérisation des cellules après 27 jours de différenciation

(A) Les cellules à 27 traitées avec l'AR+EGF expriment POU4F3 (vert) et la MYO7A (rouge). Les progéniteurs otiques issus du traitement FSBD jusqu'à J6, suivi de FGF3/10 et Wnt3, ont été gardé en milieu DFNB seul (B,B') ou supplémenté avec AR+EGF (C,C'). On remarque que l'expression des marqueurs otiques tardifs en présence d'AR+EGF est comparable à celle en présence de DFNB seul. L'expression de ces marqueurs semble être plus importante à J27 dans les deux conditions. FSBD : traitement FGF3/10 + SB + Dkk1 ; DFNB : milieu DMEM/F12 + N2 + B27.

Limites de cette étude

Dans les deux études décrites dans cette thèse, la caractérisation du phénotype de nos cellules différenciées est fondée sur des techniques de biologie moléculaire et d'immunocytochimie. Nous avons analysé le devenir des cellules d'abord par qPCR. Cette méthode quantitative permet de déterminer une valeur absolue ou relative de l'expression d'un gène d'intérêt. Cette technique a plusieurs avantages, notamment en termes de sensibilité et de spécificité. Cependant, il ne peut cibler qu'un seul gène par dosage, par conséquent, de nombreuses opérations qPCR sont nécessaires pour quantifier de multiples gènes et donc les résultats sont plus longs à obtenir. Ainsi, pour remédier à ce problème, nous avons eu recours à la technique de Fluidigm. Contrairement à la qPCR, cette approche permet de quantifier en même temps des dizaines à des centaines de gènes, ce qui nous a permis d'élargir notre liste de marqueurs otiques étudiés. De plus, elle présente de très nombreux avantages : facilité d'utilisation, rapidité, flexibilité et diminution des coûts. Grâce à la technique Fluidigm, nous avons pu à la fois renforcer nos résultats qPCR pour certains gènes et cribler un plus grand nombre de gènes, exprimés durant le développement de l'oreille interne *in vivo*, afin de confirmer l'identité otique de nos cellules. A côté de ces techniques de biologie moléculaire, nous avons recherché par immunocytochimie la présence de certains marqueurs otiques précoces (PAX2, GATA3, DLX5) et tardifs (POU4F3 et MYO7A). Cette technique consiste à détecter la présence d'une protéine d'intérêt à l'aide d'un anticorps, elle permet donc de vérifier la localisation de la protéine.

Grâce à ces différentes techniques, nous avons montré que trois lignées d'iPSC humaines (P11025, ChiPSC4 et ASC) sont capables de se différencier *in vitro* en progéniteurs otiques et donnent naissance à des CC. Ces résultats quantitatifs sont encourageants. Une étude plus détaillée sur l'expression des marqueurs otiques sera indispensable pour appuyer d'avantage la pertinence de notre protocole de différenciation. Il sera par exemple important d'examiner la présence de certains marqueurs de CC difficilement visualisables par immunocytochimie, comme MYO7A et MYO6, par d'autres techniques comme le Western blot. Cette technique renseigne non seulement sur la quantité de protéine présente mais donne en plus des renseignements au niveau de la qualité de la protéine d'intérêt, pour vérifier qu'elle n'est pas dégradée.

En outre, sur le plan moléculaire, une analyse transcriptomique plus approfondie sera intéressante pour renforcer les résultats obtenus par qPCR et Fluidigm. On pourrait

éventuellement utiliser des puces à ADN ou encore une technique de séquençage à haut débit (RNAseq). Ces nouvelles approches techniques devraient nous permettre non seulement de mesurer l'expression simultanée de tous les gènes dans nos cellules différenciées, mais aussi de mettre en évidence de nouveaux gènes candidats, nécessaires pour la différenciation otique à partir des cellules souches. D'ailleurs, dans notre deuxième article, nous montrons quelques résultats préliminaires obtenus par RNAseq : nous travaillons actuellement en collaboration avec un ingénieur de la plateforme transcriptomique Acobium (Montpellier) sur l'analyse de ces résultats. Nous allons prochainement pouvoir bénéficier de ces données, qui seront intégrées dans notre article II.

Parmi les objectifs initiaux de ma thèse figurait la caractérisation électrophysiologique des cellules otiques après différenciation. Cependant, nous avons rencontré deux difficultés qui ne nous ont pas encore permis de mener à bien cette étude. Premièrement, nous avons été confrontés au problème d'hétérogénéité dans nos cultures : les progéniteurs obtenus ne présentaient pas une morphologie homogène et exprimaient de manière différentielle les marqueurs otiques, notamment les marqueurs de CC. Deuxièmement, nous n'avons pas de marqueur de CC matures fonctionnelles. De ce fait, il nous a été difficile de les repérer en nous basant simplement sur leur morphologie en contraste de phase. Malgré tout, en collaboration avec l'équipe du Dr Patrick Delmas, spécialiste des canaux ioniques et de la transduction sensorielle, nous avons fait un test préliminaire dans le cadre de notre étude sur l'inhibition de Notch (Article I). Nous avons fait des enregistrements électrophysiologiques sur quelques cellules à J20 après inhibition de Notch. Les cellules ont été plutôt faciles à enregistrer et présentaient une bonne adhérence. Les enregistrements obtenus ont montré la présence des différents types de canaux voltage-dépendants indiqués dans la **figure 14**. Les courants observés correspondaient à ceux obtenus dans l'étude d'Oshima avec des ESC et des iPSC murines (Oshima et al., 2010). Cependant, nous n'avons pas poursuivi ces enregistrements tant que nous ne disposions pas d'un moyen d'identifier spécifiquement les cellules ciliées vivantes en culture.

Ces résultats semblent encourageants, mais nécessitent encore beaucoup de mise au point notamment concernant la traçabilité des CC. Idéalement, il serait bien d'avoir une lignée porteuse d'un gène rapporteur (comme la GFP), permettant de localiser les cellules d'intérêt facilement puis de faire leur caractérisation électrophysiologique pour vérifier qu'il s'agit bien de CC fonctionnelles.

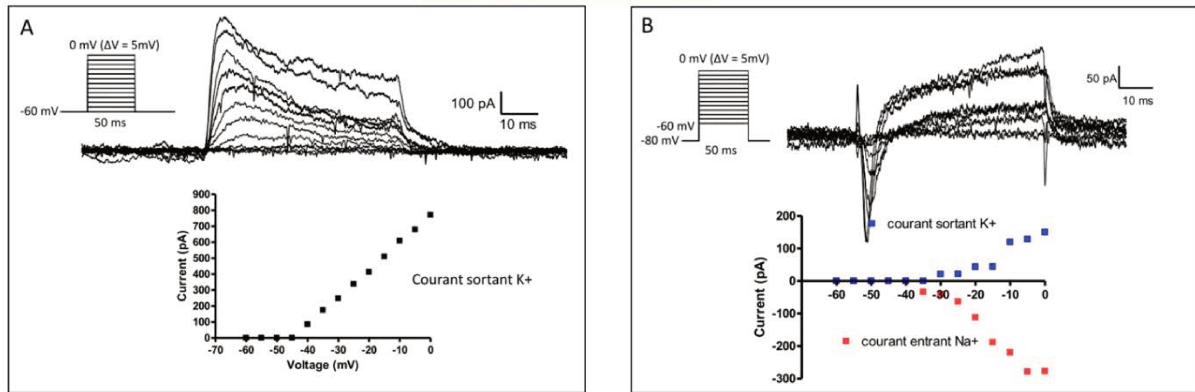
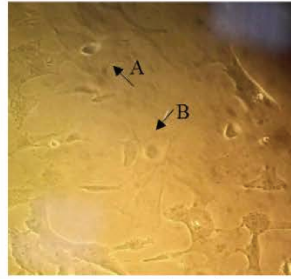


Figure 14: Enregistrement des courants voltage-dépendants à partir des hiPSC à J20 différenciées après inhibition de Notch

On observe différents types de courants voltage-dépendants : en (A), une cellule exprime exclusivement des canaux K^+ qui génèrent un courant sortant et en (B), une cellule exprime à la fois des canaux Na^+ et K^+ qui génèrent un courant entrant et sortant.

Obtenir de nouvelles CC fonctionnelles *in vitro* constituerait une avancée technologique majeure pour restaurer l'audition par thérapie cellulaire. Cependant, nous sommes encore bien loin de pouvoir prétendre à régénérer complètement une CC mature et fonctionnelle *in vitro*. En effet, obtenir des CC fonctionnelles exige que des stéréocils intacts et bien organisés soient présents, puisqu'ils constituent le siège de la transduction mécano-électrique. Ainsi, avant de nous intéresser à la caractérisation électrophysiologique *in vitro*, nous pourrions d'abord montrer la présence de stéréocils dans les cellules différenciées. Malheureusement, dans nos deux modèles de culture présentés dans les Articles I et II, nous n'avons pas réussi à voir des stéréocils, que ce soit en immunocytochimie ou par microscopie électronique à balayage. Ce point mérite encore plus d'investigations afin de mieux déterminer le phénotype de nos cellules.

Dans les deux articles présentés dans cette thèse, nous sommes intéressés plutôt à la cellule ciliée et les voies de signalisations impliquées dans leur différenciation. Cependant, régénérer des CC *in vitro* même matures, fonctionnelles et correctement innervées, ne suffirait pas pour restaurer complètement l'épithélium cochléaire. Il pourrait encore manquer les structures de soutien comme les cellules de soutien ou les neurones. Ainsi, il serait intéressant de voir, dans nos deux modèles de culture (Article I et II), si nos cellules différenciées expriment des marqueurs de cellules de soutien ou encore des marqueurs neuronaux.

***CONCLUSIONS ET
PERSPECTIVES***

Les surdités neurosensorielles constituent un problème majeur de santé public, d'autant que le nombre des personnes qui en souffrent ne cesse d'augmenter. L'Organisation Mondiale de la Santé estime que d'ici 2050, plus d'un milliard de personnes seront en situation de déficience auditive. Les traitements disponibles à l'heure actuelle sont limités à des techniques de suppléance de la fonction auditive (prothèses auditives, implants cochléaires). L'absence de traitements curatifs a suscité l'intérêt des chercheurs pour trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de restaurer la fonction auditive. En effet, les récents progrès de la thérapie cellulaire dans le traitement des maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer ou encore la sclérose en plaques, ont fait naître l'espoir qu'une telle stratégie puisse également restaurer l'audition chez les malentendants. Cependant, avant d'envisager une greffe *in vivo*, une telle approche nécessite une bonne maîtrise de la différenciation *in vitro* des cellules souches en cellules neurosensorielles. Les études présentées dans cette thèse, utilisant des techniques *in vitro* et *in vivo*, apportent une meilleure connaissance des mécanismes de différenciation *in vitro* des iPSC humaines en cellules otiques ainsi que des données nécessaires pour continuer l'évaluation de leur potentiel thérapeutique *in vivo* (voir Annexe I).

En effet, nous avons montré d'une part que l'inhibition tardive de la voie Notch favorise la différenciation des hiPSC en CC (Article I). D'autre part, nous avons démontré que l'inhibition de la voie Wnt durant la première phase de différenciation est nécessaire pour l'induction otique et initie la spécification du phénotype CC (Article II). Ces résultats sont d'une importance cruciale puisqu'ils apportent de nouveaux arguments en faveur de l'implication des voies Notch et Wnt dans la différenciation otique *in vitro*. Toutefois, des études plus approfondies sont nécessaires pour évaluer et comparer l'effet combiné de la modulation de Wnt et Notch. Ainsi, nos travaux soulèvent de très nombreuses perspectives tant d'un point de vue fondamental que thérapeutique. Trois grands axes de recherches complémentaires doivent être développés pour : i) améliorer la compréhension des mécanismes d'action de la voie Wnt et Notch sur la différenciation des hiPSC en CC, ii) approfondir l'analyse phénotypique et électrophysiologique des CC générées et iii) examiner le potentiel thérapeutique de ces cellules et leur devenir après greffe *in vivo* (voir Annexe I).

Premièrement, en ce qui concerne l'étude de l'interaction entre Notch et Wnt, nous avons déjà évalué l'effet de l'inhibition de Notch sur des progéniteurs otiques issus du protocole d'induction avec modulation de Wnt (Article II). Des cellules à J13 ont été traitées pendant une semaine avec deux molécules inhibitrices de la gamma-sécrétase (la DBZ utilisée dans l'article I, ou la DAPT), ou avec la combinaison AR+EGF (Article I). Les résultats de la quantification

de certains marqueurs précoces de CC (ATOH1, POU4F3 et MYO7A) montrent une up-régulation de POU4F3 dans toutes les conditions et un effet comparable des deux molécules inhibitrices de la voie Notch. De plus, l'expression de ce marqueur à J20 ne montre pas de différence significative par rapport à J13 (Figure n°). Ces résultats suggèrent qu'à ce stade de différenciation, l'inhibition de Notch n'était pas nécessaire, les cellules étaient déjà engagées dans la différenciation otique tardive et poursuivre l'inhibition de Notch n'apporte pas d'amélioration. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait peut-être analyser l'expression des marqueurs tardifs de CC. En outre, pour poursuivre la compréhension des mécanismes d'action de la voie Wnt et Notch et déterminer comment elles favorisent la différenciation des CC *in vitro*, il serait nécessaire de voir l'effet d'une double inhibition de Notch et Wnt durant la première phase d'induction (entre J0 et J13). Il a en effet été démontré que ces deux voies interagissent durant la régénération des CC *in vivo* (Jayasena et al., 2008; Romero-Carvajal et al., 2015). Dans une étude récente, Ni et ses collaborateurs montrent que la seule modulation de Wnt, ou bien la seule inhibition de Notch, n'était pas la solution idéale pour une régénération à long terme des CC. Cette étude a montré que l'activation de Wnt suivie d'une inhibition de Notch favorise une régénération des CC dans des cochlées normales et lésées de souris postnatales, tout en préservant les cellules de soutien. Le traçage des nouvelles cellules montre que les CC ont été régénérées par mitose et non pas par trans-différenciation des cellules de soutien (Ni et al., 2016). Une autre étude supporte ces résultats : elle montre que l'inhibition de Notch associée à une activation de Wnt induit la prolifération des cellules de soutien puis une régénération des CC dans les utricules de souris (Wu et al., 2016), ce qui suggère que la régénération mitotique des CC dépend non seulement de l'action de la voie Notch, mais aussi celle de Wnt. Il y a donc une interaction (*crosstalk*) entre ces deux voies de signalisation qui régule la différenciation des CC.

L'efficacité de nos deux protocoles, en termes de différenciation précoce des hiPSC en progéniteurs otiques, a été évaluée par une étude quantitative de l'expression de PAX2 dans nos cellules (55% à J6 Article II vs 12% Article I). Il est vrai que PAX2 est un marqueur robuste de la placode otique ; cependant, il serait intéressant de regarder si les cellules PAX2 positives co-expriment d'autres marqueurs de la placode otique comme DLX5 et GATA3. Pour la caractérisation du phénotype de la CC, nous avons examiné l'expression de plusieurs marqueurs embryonnaires (ATOH1, MYO6, POU3F4, POU4F3, MYO3A, MYO7A et MYO15A) et mature (AQP1, OTOF, TMC4, CHNRA10 et LBH) de la CC, par qPCR, par Fluidigm ou encore par RNaseq. En revanche, certains anticorps n'étant pas disponibles, nous nous sommes

contentés d'examiner l'expression de deux marqueurs tardifs de la CC, POU4F3 et MYO7A, par immunocytochimie. Ainsi, il sera nécessaire d'évaluer l'expression d'autres marqueurs, notamment la MYO6 et MYO15A.

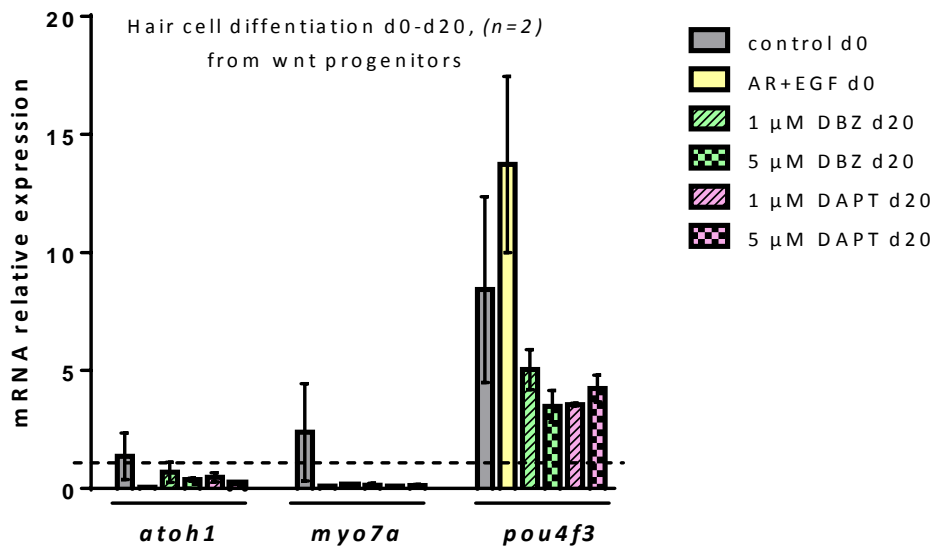


Figure 15: Caractérisation des cellules traitées avec Wnt puis Notch

Deuxièmement, il est vrai qu'avoir des CC fonctionnelles, avec des stéréocils matures, serait l'idéal pour envisager une restauration de l'audition par thérapie cellulaire. Toutefois, une thérapie cellulaire est particulièrement complexe dans l'organe de Corti où siègent les CC. Contrairement à d'autres tissus, comme la moelle osseuse, où les cellules sont peu organisées, l'organe de Corti est un tissu très bien organisé, extrêmement différencié, et dont les propriétés mécaniques, liées à sa morphologie, sont essentielles à sa fonction. Dans cet organe, chaque cellule ciliée répond à une fréquence sonore précise selon sa localisation. Avoir des CC matures et fonctionnelles *in vitro* ne suffirait donc pas pour régénérer complètement l'organe de Corti *in vivo*. Après transplantation, les cellules devraient encore se différencier à des localisations précises pour être stimulées correctement. De plus, le nombre de ces cellules doit être régulé puisque des cellules ciliées surnuméraires conduisent aussi à une perte d'audition (Gubbels et al., 2008; Hayashi et al., 2007; Mansour et al., 2009). Cependant, est-il vraiment nécessaires de greffer des CC matures et fonctionnelles pour restaurer la fonction auditive? Au lieu de chercher à obtenir des CC matures *in vitro*, ne serait-il pas plus judicieux de greffer des cellules progénitrices? Des cellules au stade de progéniteurs seraient plus compétentes pour régénérer les cellules endommagées. De ce fait, au lieu de chercher à avoir des CC fonctionnelles *in vitro*,

il serait plutôt intéressant de trouver un moyen pour trier les cellules au stade progéniteur, en gardant uniquement celles exprimant exclusivement les marqueurs otiques. Cela pourrait être accompli en utilisant un marqueur de surface, ou encore une lignée rapportrice. D'ailleurs, le consortium européen auquel notre équipe est rattaché a généré une lignée Pax2-GFP que nous allons bientôt recevoir. Cela facilitera la traçabilité des cellules *in vitro*, ou même *in vivo* : nous pourrions d'abord les purifier par cytométrie en flux, ensuite les propager. Cela permettrait d'enrichir la population otique avant de les greffer. Nous bénéficions aussi d'une lignée hiPSC Myo7a-GFP, sur laquelle nous avons le privilège d'être les premiers à travailler. Nous avons déjà commencé à explorer son potentiel de différenciation en cellules otiques. Malheureusement, l'expression de la GFP reste pour l'instant trop faible pour obtenir des résultats concluants. Cela est peut être dû à une inhibition de l'expression de la GFP au fur et à mesure des passages des hiPSC pendant la propagation. Cependant, cette lignée serait d'une grande importance pour la caractérisation électrophysiologique des CC obtenus *in vitro* puis greffés *in vivo*.

Troisièmement et dernièrement, à côté des études *in vitro*, nous étions curieux de voir quel est le potentiel thérapeutique de nos progéniteurs otique, lorsqu'ils seront injectés dans un modèle d'ototoxicité. Nos premiers essais de greffe *in vivo* sont encourageants (voir **Annexe 1**). Cependant, il est nécessaire d'avoir un moyen de suivre les cellules après greffe. Ainsi, avoir une lignée rapportrice serait utile non seulement *in vitro* mais surtout *in vivo*. Elle nous permettra de localiser nos cellules après greffe par immunohistochimie, de voir si elles sont attirées par les lésions et d'évaluer leur devenir.

Dans les deux articles présentés dans cette thèse, nous sommes intéressés plutôt à la cellule ciliée et les voies de signalisations impliquées dans leur différenciation. Cependant, régénérer des CC *in vitro* même matures, fonctionnelles et correctement innervées, ne suffirait pas pour restaurer complètement l'épithélium cochléaire. Il pourrait encore manquer les structures de soutien comme les cellules de soutien ou les neurones. Ainsi, il serait intéressant de voir, dans nos deux modèles de culture (Article I et II), si nos cellules différenciées expriment des marqueurs de cellules de soutien ou encore des marqueurs neuronaux. En outre, les iPSC sont connues pour leur instabilité génétique, due principalement à l'utilisation de rétrovirus et d'oncogènes durant la reprogrammation. Elles peuvent donc accumuler des anomalies génétiques après plusieurs passages. De ce fait, il serait judicieux de voir le caryotype de nos cellules aux passages utilisés pour les différenciations.

Pour conclure, les travaux présentés dans cette thèse fournissent de nouvelles données sur les voies de signalisation qui devraient être moduler *in vitro* pour différencier des cellules souches en progéniteurs otiques puis CC. Nous montrons deux protocoles simples de différenciation en monocouches d'hiPSC humaines en cellules otiques. Les résultats obtenus pourraient contribuer à développer une stratégie de thérapie cellulaire basée sur la greffe des cellules otiques progénitrices pour traiter les surdités neurosensorielles.

ANNEXE

Vers l'évaluation du potentiel thérapeutique des iPSC humaines dans la surdité neurosensorielle

Parallèlement à l'étude *in vitro* des voies de signalisation nécessaires à la différenciation des iPSC humaines en cellules ciliées, nous nous étions curieux de voir quel pourrait être l'apport d'une greffe de nos cellules *in vivo*. En collaboration avec une collègue, j'ai souhaité approfondir l'évaluation du potentiel thérapeutique de nos progéniteurs otiques dans un modèle de surdité neurosensorielle. Pour cela, nous avons choisi de travailler sur un modèle d'ototoxicité chez le cobaye dans le but de reproduire l'ototoxicité pharmaco-induite observée en clinique, une cause de surdité de plus en plus fréquente chez l'homme. Les objectifs de notre étude *in vivo* étaient doubles. Dans un premier temps, nous devions mettre au point le modèle animal, car établir un modèle fiable d'ototoxicité était la condition *sine qua non* pour démarrer les stratégies de greffes. Ensuite, nous devions étudier les différentes stratégies nécessaires pour optimiser le taux de réussite de nos greffes : par quelle voie faudrait-il injecter les cellules ? Puisqu'il s'agit de xéngreffes (cellules humaines transplantées chez le cobaye), est-il nécessaire d'administrer un traitement immunosuppresseur ?

Après plusieurs essais, nous avons réussi à développer un bon modèle de surdité bien caractérisé chez le cobaye. En résumé, les animaux recevaient un trauma ototoxique par administration d'un antibiotique de la classe des aminoglycosides, l'amikacine, que nous avons injecté quotidiennement par voie intramusculaire pendant 15 jours (**Figure 16A**). La perte auditive a été évaluée par plusieurs techniques allant de l'immunohistochimie jusqu'à l'électrophysiologie. Au niveau cellulaire, nous avons observé une perte importante de CC, internes et externes, qui a désorganisé l'architecture de l'organe de Corti (**Figure 16B**). Cette perte a aussi été validée au niveau fonctionnel, en mesurant les potentiels évoqués auditifs du tronc cérébral, les ABR (*Auditory Brain Responses*) : le seuil auditif a monté après injection d'amikacine (**Figure 16C,D**). Ensuite, des progéniteurs otiques issus de la différenciation des hiPSC avec un traitement FGF3 et FGF10 pendant 13 jours (protocole de l'article I) ont été marqués avec un colorant rouge, le Vybrant (Thermo Fisher Scientific), qui pénètre et colore les cellules vivantes, permettant ainsi leur traçabilité après greffe. Une fois marquées, les cellules ont été injectées unilatéralement par cochléostomie à la dose de 40 000 cellules par cochlée, technique qui consiste à perforer la cochlée en traversant l'os et la strie vasculaire au niveau du premier tour de la cochlée ; l'oreille controlatérale a servi de témoin. Afin d'éviter le rejet de nos greffons, un traitement immunosuppresseur a été administré aux cobayes par

injection sous-cutanée de ciclosporine (15 mg/kg/j) à partir de 2 jours avant greffe jusqu'aux 7 jours après greffe.

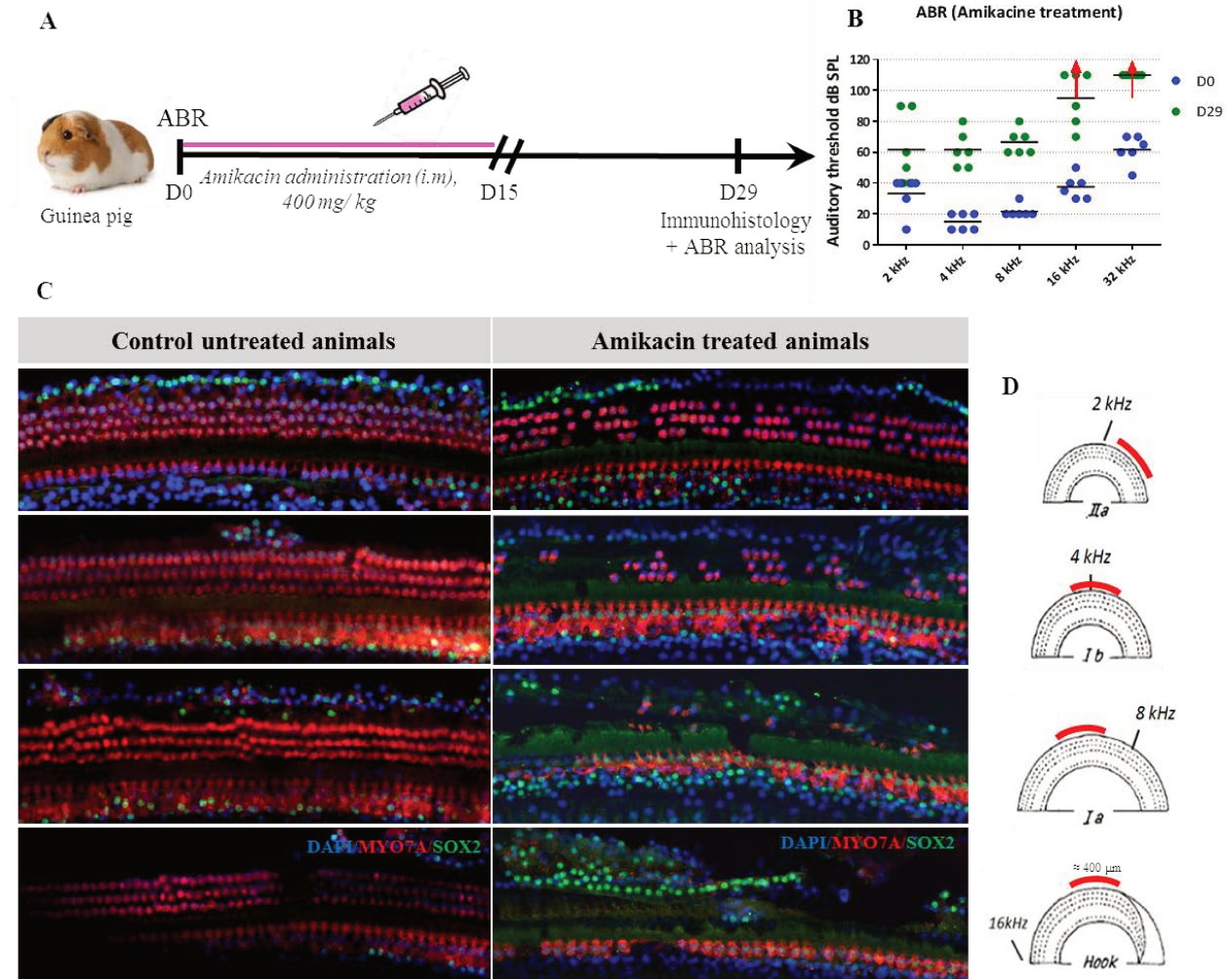


Figure 16: Caractérisation du modèle d'ototoxicité chez le cobaye

(A) protocole d'induction d'ototoxicité chez le cobaye induit par injection de l'amikacine par voie intramusculaire (i.m.) pendant 15 jours. (B) Les enregistrements ABR montrent une augmentation du seuil auditif. (C,D) L'analyse immunohistochimique montre une désorganisation de l'épithélium cochléaire et une perte des cellules ciliées tout le long de la cochlée, comme le montre l'immunomarquage de la Myosine 7a (rouge).

Afin d'évaluer le taux de survie de nos greffons, les animaux (5 par groupe) ont été sacrifiés à différents temps : 4, 14 et 60 jours post-greffe. L'analyse immunohistochimique des épithéliums cochléaires a montré la présence de cellules marquées au Vybrant aux différents temps post-greffe (4, 14 et 60 jours post-greffe), tout au long de l'épithélium cochléaire, avec un nombre plus important au niveau du premier et du deuxième tour de la cochlée mais aussi au niveau de la strie vasculaire et du modiolus (**Figure 17**). Cependant, le nombre de cellules avait tendance à diminuer en fonction du temps post-greffe, mais il est difficile de savoir s'il

s'agissait vraiment d'une diminution du nombre des cellules greffées ou d'une dégradation du Vybrant. En outre, l'analyse quantitative a montré que, chez les animaux immunodéprimés, le nombre des cellules Vybrant-positives était plus important par rapport aux animaux témoins (197 ± 120 vs 60 ± 23 par cochlée, $n = 2$). De plus, les cellules Vybrant-positives ont été retrouvées à une distance plus importante du bord ($>20 \mu\text{m}$) à l'intérieur de l'épithélium chez les animaux traités avec de la ciclosporine vs $14 \mu\text{m}$ de la membrane basale chez les témoins. Ces résultats suggèrent que l'immunosuppression favorise la survie et la migration des cellules greffées. Ces données restent préliminaires mais elles sont tout de même encourageantes. Afin de mieux évaluer l'efficacité et le potentiel thérapeutique de nos progéniteurs otiques, nous sommes en train d'étudier leur capacité de migration d'une façon plus approfondie ainsi que leur devenir cellulaire après greffe.

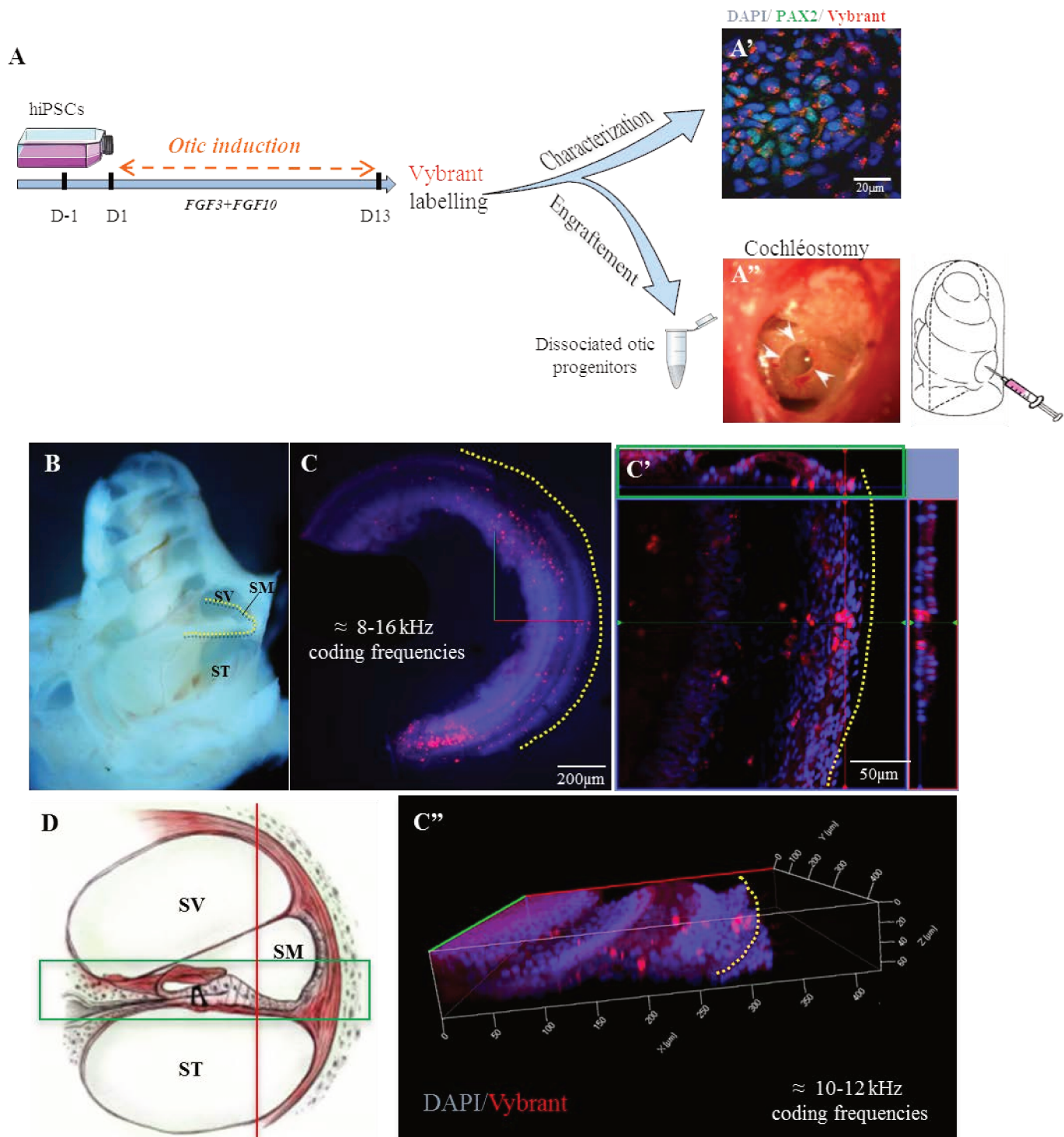


Figure 17: Localisation des cellules 14 jours après la greffe

(A) Protocole de préparation des cellules : après 13 jours d'induction par traitement FGF3 et FGF10, les cellules ont été marquées avec du Vybrant (rouge) et expriment PAX2 (en vert) (A'). Puis elles ont été greffées par cochléostomie (A''). (B-C'') Après 14 jours, les cellules en rouge ont été retrouvées au niveau des différents tours de la cochlée, mais principalement au niveau du premier tour (ligne pointillée jaune). SV : scala vascularis, SM : scala media, ST : scala tympanic.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adamska, M., Herbrand, H., Adamski, M., Krüger, M., Braun, T., and Bober, E. (2001). FGFs control the patterning of the inner ear but are not able to induce the full ear program. *Mech. Dev.* *109*, 303–313.

Almeida-Branco, M.S., Cabrera, S., and Lopez-Escamez, J.A. (2015). Perspectives for the treatment of sensorineural hearing loss by cellular regeneration of the inner ear. *Acta Otorrinolaringol. Engl. Ed.* *66*, 286–295.

Alvarez, Y., Alonso, M.T., Vendrell, V., Zelarayan, L.C., Chamero, P., Theil, T., Bosl, M.R., Kato, S., Maconochie, M., Riethmacher, D., et al. (2003). Requirements for FGF3 and FGF10 during inner ear formation. *Development* *130*, 6329–6338.

Van Amerongen, R., and Nusse, R. (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Dev. Camb. Engl.* *136*, 3205–3214.

Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., and Lake, R.J. (1999). Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* *284*, 770–776.

Atkinson, P.J., Huarcaya Najarro, E., Sayyid, Z.N., and Cheng, A.G. (2015). Sensory hair cell development and regeneration: similarities and differences. *Development* *142*, 1561–1571.

Basch (2016). Fine-tuning of Notch signaling sets the boundary of the organ of Corti and establishes sensory cell fates.

Bermingham, N.A., Hassan, B.A., Price, S.D., Vollrath, M.A., Ben-Arie, N., Eatock, R.A., Bellen, H.J., Lysakowski, A., and Zoghbi, H.Y. (1999). *Math1*: an essential gene for the generation of inner ear hair cells. *Science* *284*, 1837–1841.

Boëda, B., El-Amraoui, A., Bahloul, A., Goodyear, R., Daviet, L., Blanchard, S., Perfettini, I., Fath, K.R., Shorte, S., Reiners, J., et al. (2002). Myosin VIIa, harmonin and cadherin 23, three Usher I gene products that cooperate to shape the sensory hair cell bundle. *EMBO J.* *21*, 6689–6699.

Bouchard, M., de Caprona, D., Busslinger, M., Xu, P., and Fritsch, B. (2010). Pax2 and Pax8 cooperate in mouse inner ear morphogenesis and innervation. *BMC Dev. Biol.* *10*, 89.

Bouillet, P., Oulad-Abdelghani, M., Ward, S.J., Bronner, S., Chambon, P., and Dollé, P. (1996). A new mouse member of the Wnt gene family, mWnt-8, is expressed during early embryogenesis and is ectopically induced by retinoic acid. *Mech. Dev.* *58*, 141–152.

Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H., and Robertson, E. (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* *309*, 255–256.

Bramhall, N.F., Shi, F., Arnold, K., Hochedlinger, K., and Edge, A.S.B. (2014). Lgr5-Positive Supporting Cells Generate New Hair Cells in the Postnatal Cochlea. *Stem Cell Rep.* *2*, 311–322.

Burton, Q., Cole, L.K., Mulheisen, M., Chang, W., and Wu, D.K. (2004). The role of Pax2 in mouse inner ear development. *Dev. Biol.* *272*, 161–175.

- Cadigan, K.M., and Nusse, R. (1997). Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* *11*, 3286–3305.
- Carnicero, E., Zelarayan, L.C., Rüttiger, L., Knipper, M., Alvarez, Y., Alonso, M.T., and Schimmang, T. (2004). Differential roles of fibroblast growth factor-2 during development and maintenance of auditory sensory epithelia. *J. Neurosci. Res.* *77*, 787–797.
- Centelles, J.J. (2012). General Aspects of Colorectal Cancer.
- Chen, J., and Streit, A. (2013). Induction of the inner ear: stepwise specification of otic fate from multipotent progenitors. *Hear. Res.* *297*, 3–12.
- Chen, J., Tambalo, M., Barembaum, M., Ranganathan, R., Simoes-Costa, M., Bronner, M.E., and Streit, A. (2017). A systems-level approach reveals new gene regulatory modules in the developing ear. *Development* *144*, 1531–1543.
- Chen, J.R., Tang, Z.H., Zheng, J., Shi, H.S., Ding, J., Qian, X.D., Zhang, C., Chen, J.L., Wang, C.C., Li, L., et al. (2016). Effects of genetic correction on the differentiation of hair cell-like cells from iPSCs with MYO15A mutation. *Cell Death Differ* *23*, 1347–1357.
- Chen, P., Johnson, J.E., Zoghbi, H.Y., and Segil, N. (2002). The role of Math1 in inner ear development: Uncoupling the establishment of the sensory primordium from hair cell fate determination. *Dev. Camb. Engl.* *129*, 2495–2505.
- Chen, W., Jongkamonwiwat, N., Abbas, L., Eshtan, S.J., Johnson, S.L., Kuhn, S., Milo, M., Thurlow, J.K., Andrews, P.W., Marcotti, W., et al. (2012). Restoration of auditory evoked responses by human ES-cell-derived otic progenitors. *Nature* *490*, 278–282.
- Chonko, K.T., Jahan, I., Stone, J., Wright, M.C., Fujiyama, T., Hoshino, M., Fritsch, B., and Maricich, S.M. (2013a). Atoh1 directs hair cell differentiation and survival in the late embryonic mouse inner ear. *Dev. Biol.* *381*, 401–410.
- Chonko, K.T., Jahan, I., Stone, J., Wright, M.C., Fujiyama, T., Hoshino, M., Fritsch, B., and Maricich, S.M. (2013b). Atoh1 directs hair cell differentiation and survival in the late embryonic mouse inner ear. *Dev. Biol.* *381*, 401–410.
- Clack, J.A. (1993). Homologies in the fossil record: the middle ear as a test case. *Acta Biotheor.* *41*, 391–409.
- Corwin, J.T., and Cotanche, D.A. (1988). Regeneration of sensory hair cells after acoustic trauma. *Science* *240*, 1772–1774.
- Costa, A., Sanchez-Guardado, L., Juniat, S., Gale, J.E., Daudet, N., and Henrique, D. (2015). Generation of sensory hair cells by genetic programming with a combination of transcription factors. *Development* *142*, 1948–1959.
- Coyne, P. (1876). Anatomie et developpement des parties molles de l'oreille interne (G. Masson).
- Cusimano, F., Martinez, E., and Rizzo, C. (1991). The Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* *22*, 49–58.

- Daudet, N. (2005). Two contrasting roles for Notch activity in chick inner ear development: specification of prosensory patches and lateral inhibition of hair-cell differentiation. *Development* *132*, 541–551.
- Daudet, N., Ariza-McNaughton, L., and Lewis, J. (2007). Notch signalling is needed to maintain, but not to initiate, the formation of prosensory patches in the chick inner ear. *Development* *134*, 2369–2378.
- De, A. (2011). Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* *43*, 745–756.
- DeJonge, R.E., Liu, X.-P., Deig, C.R., Heller, S., Koehler, K.R., and Hashino, E. (2016). Modulation of Wnt Signaling Enhances Inner Ear Organoid Development in 3D Culture. *PLOS ONE* *11*, e0162508.
- Dincer, Z., Piao, J., Niu, L., Ganat, Y., Kriks, S., Zimmer, B., Shi, S.-H., Tabar, V., and Studer, L. (2013). Specification of Functional Cranial Placode Derivatives from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep.* *5*, 1387–1402.
- Driver, E.C., and Kelley, M.W. (2009). Specification of cell fate in the mammalian cochlea. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* *87*, 212–221.
- Ealy, M., Ellwanger, D.C., Kosaric, N., Stapper, A.P., and Heller, S. (2016). Single-cell analysis delineates a trajectory toward the human early otic lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, 8508–8513.
- Ebert, A.D., Liang, P., and Wu, J.C. (2012). Induced Pluripotent Stem Cells as a Disease Modeling and Drug Screening Platform. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* *60*, 408–416.
- El-Amraoui, A., Lefèvre, G., Hardelin, J.-P., and Petit, C. (2005). Syndrome de Usher de type 1 et développement de la touffe ciliaire des cellules sensorielles de l'oreille interne. *Médecine/Sciences* *21*, 737–740.
- Fantetti, K.N., and Fekete, D.M. (2012). Members of the BMP, Shh and FGF morphogen families promote chicken statoacoustic ganglion neurite outgrowth and neuron survival in vitro. *Dev. Neurobiol.* *72*, 1213–1228.
- Forge, A., Li, L., Corwin, J.T., and Nevill, G. (1993). Ultrastructural evidence for hair cell regeneration in the mammalian inner ear. *Science* *259*, 1616–1619.
- Francis, V. (2013). *Imagerie de l'oreille et de l'os temporal - Volume 1 : Anatomie et imagerie normales* (Lavoisier).
- Fritsch, B., and Straka, H. (2014). Evolution of vertebrate mechanosensory hair cells and inner ears: toward identifying stimuli that select mutation driven altered morphologies. *J. Comp. Physiol. A* *200*, 5–18.
- Gayon, J., and Ricqlès (de), A. (2015). *Les fonctions : des organismes aux artefacts* (Presses Universitaires de France).
- Graham, A., and Shimeld, S.M. (2013). The origin and evolution of the ectodermal placodes. *J. Anat.* *222*, 32–40.

- Gubbels, S.P., Woessner, D.W., Mitchell, J.C., Ricci, A.J., and Brigande, J.V. (2008). Functional auditory hair cells produced in the mammalian cochlea by in utero gene transfer. *Nature* 455, 537–541.
- Gunewardene, N., Bergen, N.V., Crombie, D., Needham, K., Dottori, M., and Nayagam, B.A. (2014). Directing Human Induced Pluripotent Stem Cells into a Neurosensory Lineage for Auditory Neuron Replacement. *BioResearch Open Access* 3, 162–175.
- Hardelin, J.-P., Denoyelle, F., Levilliers, J., Simmler, M.-C., and Petit, C. (2004). Les surdités héréditaires: génétique moléculaire. *Médecine/Sciences* 20, 311–316.
- Hartman, B.H., Reh, T.A., and Bermingham-McDonogh, O. (2010). Notch signaling specifies prosensory domains via lateral induction in the developing mammalian inner ear. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 15792–15797.
- Hasson, T. (1999). Molecular motors: sensing a function for myosin-VIIa. *Curr. Biol.* 9, R838–R841.
- Hayashi, T., Cunningham, D., and Bermingham-McDonogh, O. (2007). Loss of Fgfr3 leads to excess hair cell development in the mouse organ of Corti. *Dev. Dyn.* 236, 525–533.
- Hayashi, T., Ray, C.A., and Bermingham-McDonogh, O. (2008). Fgf20 Is Required for Sensory Epithelial Specification in the Developing Cochlea. *J. Neurosci.* 28, 5991–5999.
- Head, J.R., Gacioch, L., Pennisi, M., and Meyers, J.R. (2013). Activation of canonical Wnt/ β -catenin signaling stimulates proliferation in neuromasts in the zebrafish posterior lateral line: Wnt Signaling Controls Neuromast Proliferation. *Dev. Dyn.* 242, 832–846.
- Hildebrand, M.S., Dahl, H.H., Hardman, J., Coleman, B., Shepherd, R.K., and de Silva, M.G. (2005). Survival of partially differentiated mouse embryonic stem cells in the scala media of the guinea pig cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol* 6, 341–354.
- Hori, K., Sen, A., and Artavanis-Tsakonas, S. (2013). Notch signaling at a glance. *J. Cell Sci.* 126, 2135–2140.
- Hu, Z., Wei, D., Johansson, C.B., Holmström, N., Duan, M., Frisé, J., and Ulfendahl, M. (2005). Survival and neural differentiation of adult neural stem cells transplanted into the mature inner ear. *Exp. Cell Res.* 302, 40–47.
- Hume, C.R., and Dodd, J. (1993). Cwnt-8C: a novel Wnt gene with a potential role in primitive streak formation and hindbrain organization. *Dev. Camb. Engl.* 119, 1147–1160.
- Jacques, B.E., Puligilla, C., Weichert, R.M., Ferrer-Vaquer, A., Hadjantonakis, A.-K., Kelley, M.W., and Dabdoub, A. (2013). A dual function for canonical Wnt/ β -catenin signaling in the developing mammalian cochlea. *Development* 140, 247–247.
- Jacques, B.E., Montgomery, W.H., Uribe, P.M., Yatteau, A., Asuncion, J.D., Resendiz, G., Matsui, J.I., and Dabdoub, A. (2014). The role of Wnt/ β -catenin signaling in proliferation and regeneration of the developing basilar papilla and lateral line: Wnt/ β -Catenin in BP and Lateral Line HCs. *Dev. Neurobiol.* 74, 438–456.

- Jahan, I., Pan, N., and Fritzscht, B. (2015). Opportunities and limits of the one gene approach: the ability of *Atoh1* to differentiate and maintain hair cells depends on the molecular context. *Front. Cell. Neurosci.* 9.
- Jansson, L., Kim, G.S., and Cheng, A.G. (2015). Making sense of Wnt signaling—linking hair cell regeneration to development. *Front. Cell. Neurosci.* 9.
- Jayasena, C.S., Ohyama, T., Segil, N., and Groves, A.K. (2008). Notch signaling augments the canonical Wnt pathway to specify the size of the otic placode. *Development* 135, 2251–2261.
- Jeon, S.-J., Fujioka, M., Kim, S.-C., and Edge, A.S.B. (2011). Notch Signaling Alters Sensory or Neuronal Cell Fate Specification of Inner Ear Stem Cells. *J. Neurosci.* 31, 8351–8358.
- Kanherkar, R.R., Bhatia-Dey, N., Makarev, E., and Csoka, A.B. (2014). Cellular reprogramming for understanding and treating human disease. *Front. Cell Dev. Biol.* 2.
- Kelley, M.W. (2006a). Hair cell development: commitment through differentiation. *Brain Res* 1091, 172–185.
- Kelley, M.W. (2006b). Regulation of cell fate in the sensory epithelia of the inner ear. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 837–849.
- Kiernan, A.E. (2013). Notch signaling during cell fate determination in the inner ear. *Semin. Cell Dev. Biol.* 24, 470–479.
- Kiernan, A.E., Ahituv, N., Fuchs, H., Balling, R., Avraham, K.B., Steel, K.P., and de Angelis, M.H. (2001). The Notch ligand *Jagged1* is required for inner ear sensory development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 3873–3878.
- Kiernan, A.E., Xu, J., and Gridley, T. (2006). The Notch ligand *JAG1* is required for sensory progenitor development in the mammalian inner ear. *PLoS Genet.* 2, e4.
- Koehler, K.R., Mikosz, A.M., Molosh, A.I., Patel, D., and Hashino, E. (2013). Generation of inner ear sensory epithelia from pluripotent stem cells in 3D culture. *Nature* 500, 217–221.
- Koehler, K.R., Nie, J., Longworth-Mills, E., Liu, X.-P., Lee, J., Holt, J.R., and Hashino, E. (2017). Generation of inner ear organoids containing functional hair cells from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 35, 583–589.
- Kwon, H.-J., Bhat, N., Sweet, E.M., Cornell, R.A., and Riley, B.B. (2010). Identification of Early Requirements for Preplacodal Ectoderm and Sensory Organ Development. *PLoS Genet.* 6, e1001133.
- Ladher, R.K., Wright, T.J., Moon, A.M., Mansour, S.L., and Schoenwolf, G.C. (2005). FGF8 initiates inner ear induction in chick and mouse. *Genes Dev.* 19, 603–613.
- Larsen, W., Brauer, P.R., Schoenwolf, G.C., and Francis-West, P. (2017). Embryologie humaine (De Boeck Supérieur).
- Lenoir, M., Puel, J.L., and Pujol, R. (1987). Stereocilia and tectorial membrane development in the rat cochlea. A SEM study. *Anat. Embryol. (Berl.)* 175, 477–487.

- Leung, A.W., Kent Morest, D., and Li, J.Y.H. (2013). Differential BMP signaling controls formation and differentiation of multipotent preplacodal ectoderm progenitors from human embryonic stem cells. *Dev. Biol.* 379, 208–220.
- Li, H., Corrales, C.E., Wang, Z., Zhao, Y., Wang, Y., Liu, H., and Heller, S. (2005). BMP4 signaling is involved in the generation of inner ear sensory epithelia. *BMC Dev. Biol.* 5, 16.
- Lim, R., and Brichta, A.M. (2016). Anatomical and physiological development of the human inner ear. *Hear Res* 338, 9–21.
- Liu, W., Li, G., Chien, J.S., Raft, S., Zhang, H., Chiang, C., and Frenz, D.A. (2002). Sonic Hedgehog Regulates Otic Capsule Chondrogenesis and Inner Ear Development in the Mouse Embryo. *Dev. Biol.* 248, 240–250.
- Liu, X.Z., Walsh, J., Tamagawa, Y., Kitamura, K., Nishizawa, M., Steel, K.P., and Brown, S.D. (1997). Autosomal dominant non-syndromic deafness caused by a mutation in the myosin VIIA gene. *Nat. Genet.* 17, 268–269.
- Low, W., Dazert, S., Baird, A., and Ryan, A.F. (1996). Basic fibroblast growth factor (FGF-2) protects rat cochlear hair cells in organotypical culture from aminoglycoside injury. *J. Cell. Physiol.* 167, 443–450.
- Mann, Z.F., Thiede, B.R., Chang, W., Shin, J.-B., May-Simera, H.L., Lovett, M., Corwin, J.T., and Kelley, M.W. (2014). A gradient of Bmp7 specifies the tonotopic axis in the developing inner ear. *Nat. Commun.* 5.
- Mansour, S.L., Twigg, S.R.F., Freeland, R.M., Wall, S.A., Li, C., and Wilkie, A.O.M. (2009). Hearing loss in a mouse model of Muenke syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 18, 43–50.
- Masuda, M., Dulon, D., Pak, K., Mullen, L.M., Li, Y., Erkman, L., and Ryan, A.F. (2011). Regulation of Pou4f3 Gene Expression in Hair Cells by 5' DNA in Mice. *Neuroscience* 197, 48–64.
- Masuda, M., Pak, K., Chavez, E., and Ryan, A.F. (2012). TFE2 and GATA3 enhance induction of POU4F3 and myosin VIIa positive cells in nonsensory cochlear epithelium by ATOH1. *Dev. Biol.* 372, 68–80.
- Matsuoka, A.J., Morrissey, Z.D., Zhang, C., Homma, K., Belmadani, A., Miller, C.A., Chadly, D.M., Kobayashi, S., Edelbrock, A.N., Tanaka-Matakatsu, M., et al. (2017). Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells Toward Placode-Derived Spiral Ganglion-Like Sensory Neurons. *Stem Cells Transl Med* 6, 923–936.
- Mendonsa, E.S., and Riley, B.B. (1999). Genetic analysis of tissue interactions required for otic placode induction in the zebrafish. *Dev. Biol.* 206, 100–112.
- Meyer, A., Petit, C., and Safieddine, S. (2013). Thérapie génique des surdités humaines: Défis et promesses. *Médecine/Sciences* 29, 883–889.
- Mizutari, K., Fujioka, M., Hosoya, M., Bramhall, N., Okano, H.J., Okano, H., and Edge, A.S.B. (2013). Notch Inhibition Induces Cochlear Hair Cell Regeneration and Recovery of Hearing after Acoustic Trauma. *Neuron* 77, 58–69.

- Munnamalai, V., and Fekete, D.M. (2013). Wnt signaling during cochlear development. *Semin. Cell Dev. Biol.* 24, 480–489.
- Murata, J., Ikeda, K., and Okano, H. (2012). Notch signaling and the developing inner ear. In *Notch Signaling in Embryology and Cancer*, (Springer), pp. 161–173.
- Nakajima, Y. (2015). Signaling regulating inner ear development: cell fate determination, patterning, morphogenesis, and defects. *Congenit Anom Kyoto* 55, 17–25.
- Noramly, S., and Grainger, R.M. (2002). Determination of the embryonic inner ear. *J. Neurobiol.* 53, 100–128.
- Ohnishi, H., Skerleva, D., Kitajiri, S., Sakamoto, T., Yamamoto, N., Ito, J., and Nakagawa, T. (2015). Limited hair cell induction from human induced pluripotent stem cells using a simple stepwise method. *Neurosci. Lett.* 599, 49–54.
- Ohyama, T., Mohamed, O.A., Taketo, M.M., Dufort, D., and Groves, A.K. (2006). Wnt signals mediate a fate decision between otic placode and epidermis. *Dev. Camb. Engl.* 133, 865–875.
- Ohyama, T., Groves, A.K., and Martin, K. (2007). The first steps towards hearing: mechanisms of otic placode induction. *Int. J. Dev. Biol.* 51, 463–472.
- Oshima, K., Shin, K., Diensthuber, M., Peng, A.W., Ricci, A.J., and Heller, S. (2010). Mechanosensitive Hair Cell-like Cells from Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell* 141, 704–716.
- Pan, N., Jahan, I., Kersigo, J., Kopecky, B., Santi, P., Johnson, S., Schmitz, H., and Fritsch, B. (2011). Conditional deletion of *Atoh1* using *Pax2-Cre* results in viable mice without differentiated cochlear hair cells that have lost most of the organ of Corti. *Hear. Res.* 275, 66–80.
- Pan, W., Jin, Y., Stanger, B., and Kiernan, A.E. (2010). Notch signaling is required for the generation of hair cells and supporting cells in the mammalian inner ear. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 15798–15803.
- Pandit, S.R., Sullivan, J.M., Egger, V., Borecki, A.A., and Oleskevich, S. (2011). Functional Effects of Adult Human Olfactory Stem Cells on Early-Onset Sensorineural Hearing Loss. *STEM CELLS* 29, 670–677.
- Park, B.-Y., and Saint-Jeannet, J.-P. (2010). Introduction (Morgan & Claypool Life Sciences).
- Petrovic, J., Formosa-Jordan, P., Luna-Escalante, J.C., Abelló, G., Ibañes, M., Neves, J., and Giraldez, F. (2014). Ligand-dependent Notch signaling strength orchestrates lateral induction and lateral inhibition in the developing inner ear. *Dev. Camb. Engl.* 141, 2313–2324.
- Popper, A.N., and Fay, R.R. (2012). *Comparative Studies of Hearing in Vertebrates* (Springer Science & Business Media).
- Ren, H., Guo, W., Liu, W., Gao, W., Xie, D., Yin, T., Yang, S., and Ren, J. (2016). DAPT mediates *atoh1* expression to induce hair cell-like cells. *Am. J. Transl. Res.* 8, 634.

- Riccomagno, M.M., Martinu, L., Mulheisen, M., Wu, D.K., and Epstein, D.J. (2002). Specification of the mammalian cochlea is dependent on Sonic hedgehog. *Genes Dev.* *16*, 2365–2378.
- Riccomagno, M.M., Takada, S., and Epstein, D.J. (2005). Wnt-dependent regulation of inner ear morphogenesis is balanced by the opposing and supporting roles of Shh. *Genes Dev.* *19*, 1612–1623.
- Romand, R., and Varela-Nieto, I. (2014). *Development of Auditory and Vestibular Systems* (Academic Press).
- Ronaghi, M., Nasr, M., Ealy, M., Durruthy-Durruthy, R., Waldhaus, J., Diaz, G.H., Joubert, L.M., Oshima, K., and Heller, S. (2014). Inner ear hair cell-like cells from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* *23*, 1275–1284.
- Ryals, B.M., and Rubel, E.W. (1988). Hair cell regeneration after acoustic trauma in adult Coturnix quail. *Science* *240*, 1774–1776.
- Savary, E., Sabourin, J.C., Santo, J., Hugnot, J.P., Chabbert, C., Van De Water, T., Uziel, A., and Zine, A. (2008). Cochlear stem/progenitor cells from a postnatal cochlea respond to Jagged1 and demonstrate that notch signaling promotes sphere formation and sensory potential. *Mech. Dev.* *125*, 674–686.
- Savoy-Burke, G., Gilels, F.A., Pan, W., Pratt, D., Que, J., Gan, L., White, P.M., and Kiernan, A.E. (2014). Activated Notch Causes Deafness by Promoting a Supporting Cell Phenotype in Developing Auditory Hair Cells. *PLoS ONE* *9*, e108160.
- Schimmang, T. (2007). Expression and functions of FGF ligands during early otic development. *Int. J. Dev. Biol.* *51*, 473–481.
- Schlosser, G. (2006). Induction and specification of cranial placodes. *Dev. Biol.* *294*, 303–351.
- Schrijver, I. (2004). Hereditary Non-Syndromic Sensorineural Hearing Loss. *J. Mol. Diagn. JMD* *6*, 275–284.
- Shi, F., Kempfle, J.S., and Edge, A.S.B. (2012). Wnt-Responsive Lgr5-Expressing Stem Cells Are Hair Cell Progenitors in the Cochlea. *J. Neurosci.* *32*, 9639–9648.
- Shi, F., Hu, L., and Edge, A.S.B. (2013). Generation of hair cells in neonatal mice by β -catenin overexpression in Lgr5-positive cochlear progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 13851–13856.
- Simancikova, I., Bojtarova, E., Hrubisko, M., Farkas, F., Horvathova, D., Sopko, L., Batorova, A., and Mistrik, M. (2017). Autologous hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia - single center experience. *Neoplasma*.
- Slowik, A.D., and Bermingham-McDonogh, O. (2013). Notch signaling in mammalian hair cell regeneration. *Trends Dev. Biol.* *7*, 73.
- Su, Y.-X., Hou, C.-C., and Yang, W.-X. (2015). Control of hair cell development by molecular pathways involving Atoh1, Hes1 and Hes5. *Gene* *558*, 6–24.

- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.
- Tang, Z.H., Chen, J.R., Zheng, J., Shi, H.S., Ding, J., Qian, X.D., Zhang, C., Chen, J.L., Wang, C.C., Li, L., et al. (2016). Genetic Correction of Induced Pluripotent Stem Cells From a Deaf Patient With MYO7A Mutation Results in Morphologic and Functional Recovery of the Derived Hair Cell-Like Cells. *Stem Cells Transl Med* 5, 561–571.
- Tateya, T., Imayoshi, I., Tateya, I., Hamaguchi, K., Torii, H., Ito, J., and Kageyama, R. (2013). Hedgehog signaling regulates prosensory cell properties during the basal-to-apical wave of hair cell differentiation in the mammalian cochlea. *Development* 140, 3848–3857.
- Tateya, T., Sakamoto, S., Imayoshi, I., and Kageyama, R. (2015). In vivo overactivation of the Notch signaling pathway in the developing cochlear epithelium. *Hear. Res.* 327, 209–217.
- Taura, A., Nakashima, N., Ohnishi, H., Nakagawa, T., Funabiki, K., Ito, J., and Omori, K. (2016a). Regenerative therapy for vestibular disorders using human induced pluripotent stem cells (iPSCs): neural differentiation of human iPSC-derived neural stem cells after in vitro transplantation into mouse vestibular epithelia. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 136, 999–1005.
- Taura, A., Taura, K., Koyama, Y., Yamamoto, N., Nakagawa, T., Ito, J., and Ryan, A.F. (2016b). Hair cell stereociliary bundle regeneration by espin gene transduction after aminoglycoside damage and hair cell induction by Notch inhibition. *Gene Ther.* 23, 415–423.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* 282, 1145–1147.
- Tsai, H., Hardisty, R.E., Rhodes, C., Kiernan, A.E., Roby, P., Tymowska-Lalanne, Z., Mburu, P., Rastan, S., Hunter, A.J., Brown, S.D., et al. (2001). The mouse slalom mutant demonstrates a role for Jagged1 in neuroepithelial patterning in the organ of Corti. *Hum. Mol. Genet.* 10, 507–512.
- Vahava, O., Morell, R., Lynch, E.D., Weiss, S., Kagan, M.E., Ahituv, N., Morrow, J.E., Lee, M.K., Skvorak, A.B., Morton, C.C., et al. (1998). Mutation in transcription factor POU4F3 associated with inherited progressive hearing loss in humans. *Science* 279, 1950–1954.
- Varjosalo, M., and Taipale, J. (2008). Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev.* 22, 2454–2472.
- Vendrell, V., Carnicero, E., Giraldez, F., Alonso, M.T., and Schimmang, T. (2000). Induction of inner ear fate by FGF3. *Development* 127, 2011–2019.
- Warchol, M.E., Lambert, P.R., Goldstein, B.J., Forge, A., and Corwin, J.T. (1993). Regenerative proliferation in inner ear sensory epithelia from adult guinea pigs and humans. *Science* 259, 1619–1622.
- Watanabe, T., Kanai, Y., Matsukawa, S., and Michiue, T. (2015). Specific induction of cranial placode cells from *Xenopus* ectoderm by modulating the levels of BMP, Wnt, and FGF signaling: Specific Induction of Placode Cells. *Genesis* 53, 652–659.

- Welstead, G.G., Brambrink, T., and Jaenisch, R. (2008). Generating iPS Cells from MEFS through Forced Expression of Sox-2, Oct-4, c-Myc, and Klf4. *J. Vis. Exp. JoVE*.
- Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., and Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448, 318–324.
- Whitfield, T.T. (2015). Development of the inner ear. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 32, 112–118.
- Wright, T.J. (2003). Fgf3 and Fgf10 are required for mouse otic placode induction. *Development* 130, 3379–3390.
- Wright, T.J., Hatch, E.P., Karabagli, H., Karabagli, P., Schoenwolf, G.C., and Mansour, S.L. (2003). Expression of mouse fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor genes during early inner ear development. *Dev. Dyn.* 228, 267–272.
- Wu, D.K., and Kelley, M.W. (2012). Molecular Mechanisms of Inner Ear Development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a008409–a008409.
- Xu, Y.-P., Shan, X.-D., Liu, Y.-Y., Pu, Y., Wang, C.-Y., Tao, Q.-L., Deng, Y., Cheng, Y., and Fan, J.-P. (2016). Olfactory epithelium neural stem cell implantation restores noise-induced hearing loss in rats. *Neurosci. Lett.* 616, 19–25.
- Żak, M., Klis, S.F.L., and Grolman, W. (2015). The Wnt and Notch signalling pathways in the developing cochlea: Formation of hair cells and induction of regenerative potential. *Int. J. Dev. Neurosci.* 47, 247–258.
- Zelarayan, L.C., Vendrell, V., Alvarez, Y., Domínguez-Frutos, E., Theil, T., Alonso, M.T., Maconochie, M., and Schimmang, T. (2007). Differential requirements for FGF3, FGF8 and FGF10 during inner ear development. *Dev. Biol.* 308, 379–391.
- Zhao, L.-D., Guo, W.-W., Lin, C., Li, L.-X., Sun, J.-H., Wu, N., Ren, L.-L., Li, X.-X., Liu, H.-Z., Young, W.-Y., et al. (2011). Effects of DAPT and Atoh1 Overexpression on Hair Cell Production and Hair Bundle Orientation in Cultured Organ of Corti from Neonatal Rats. *PLoS ONE* 6, e23729.
- Zine, A. (2003). Molecular mechanisms that regulate auditory hair-cell differentiation in the mammalian cochlea. *Mol. Neurobiol.* 27, 223–237.
- Zine, A., Van De Water, T.R., and de Ribaupierre, F. (2000). Notch signaling regulates the pattern of auditory hair cell differentiation in mammals. *Development* 127, 3373–3383.
- Zine, A., Aubert, A., Qiu, J., Therianos, S., Guillemot, F., Kageyama, R., and de Ribaupierre, F. (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.