

Université de Liège

Faculté des sciences

Unité de Biologie Cellulaire et Tissulaire – GIGA-Neurosciences

Prof. M. Thiry

**Localisation spatiotemporelle du
cytosquelette dans les cellules du canal
cochléaire chez le rat entre le 18^e jour
embryonnaire et le 15^e jour postnatal**

Mémoire présenté par

Nicolas Johnen

*En vue de l'obtention du
diplôme de Master en Biologie
des Organismes et Ecologie*

Année académique 2008-2009

REMERCIEMENTS

Je profite de ce Mémoire afin d'exprimer toute ma gratitude au Professeur Marc Thiry sans qui ce présent travail n'aurait pu être réalisé. Je le remercie particulièrement pour son accueil, ses conseils et ses critiques judicieuses et pertinentes.

Mes remerciements vont également envers les Docteurs Brigitte Malgrange et Jacques Balthazart qui m'ont permis d'accéder à leur appareillage et merci à Jean Defourny et à Jérôme Kroonen pour le temps qu'ils ont passé à m'expliquer leur fonctionnement.

La réalisation de ce mémoire aurait cependant été impossible sans l'aide tenace et la présence quotidienne de Nicolas Thelen dont l'enthousiasme et l'optimisme ont permis de réaliser ce travail dans des conditions optimales.

Mes plus vifs remerciements vont également à Françoise Lamaye pour sa présence et ses conseils avisés.

Merci à mes parents et mes frères ainsi que toutes les personnes qui m'ont soutenu et encouragé tout au long de mes études.

Enfin, merci à tous ceux qui ont, de près ou de loin, contribué à l'élaboration de ce Mémoire.

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	1.
1) L'oreille	2.
2) L'oreille interne	3.
3) L'organe de Corti	4.
a) Les cellules sensorielles	4.
b) Les cellules de soutien	6.
c) Cellules et structures adjacentes à l'organe de Corti	7.
4) Développement de la cochlée	8.
a) Développement du canal cochléaire	8.
b) Développement de l'organe de Corti	9.
5) Le cytosquelette au niveau des cellules de l'organe de Corti	11.
a) Microtubules	11.
b) Microfilaments d'actine	11.
c) Filaments intermédiaires	12.
6) Objectifs	13.
2. MATERIEL ET METHODES	14.
1) Matériel	15.
a) Matériel biologique	15.
b) Prélèvement des cochlées	15.
2) Méthodes	15.
a) Préparation des cochlées pour l'observation au microscope confocal à balayage laser	15.
b) Immunohistochimie	16.
i. Immunomarquages sur cryosections	16.
ii. Anticorps primaires	17.
iii. Anticorps secondaires	17.
iv. Marqueur nucléaire	17.
3) Observation des cryosections de cochlées au microscope confocal à balayage laser	17.
3. RESULTATS	19.
1) Embryon de rat à 18 jours	20.
2) Embryon de rat à 19 jours	21.
3) Embryon de rat à 21 jours	21.
4) Embryon de rat à 22 jours	26.
5) Rat à 0 jour	26.
6) Rat à 2 jours	27.
7) Rat à 4-5 jours	28.
8) Rat à 6 jours	33.
9) Rat à 8 jours	33.
10) Rat à 10 jours	34.
11) Rat à 11-12 jours	35.
12) Rat à 14-15 jours	35.
4. DISCUSSION	42.
1) Localisation spatiotemporelle de la tubuline β IV	43.
2) Localisation spatiotemporelle de la cytokeratine et de la vimentine	44.
5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	47.
6. BIBLIOGRAPHIE	50.

LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

μm : micromètre

Bo : cellule bordante

CK8 : cytokératine 8

CKPan : cytokératine pan

D : cellule de Deiters

Ex : embryon âgé de x jours où x représente le nombre de jours

GER : "greater epithelial ridge", grande crête épithéliale

H : cellule de Hensen

IH : cellule sensorielle interne

IP : cellule pilier interne

LER : "lesser epithelial ridge", petite crête épithéliale

mM, M : milli-, molaire

MB : membrane basilaire

OH : cellule sensorielle externe

OP : cellule pilier externe

PBS : "phosphate buffer saline", tampon phosphate salin

Ph : cellule phalangeaire

Px : x jours après la naissance où x représente le nombre de jours

RM : membrane de Reissner

SV : strie vasculaire

T : cellule tectale

S : cellule sous-tectale

V : vaisseau spiral

1. INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

Afin de découvrir et de comprendre leur environnement, les mammifères sont dotés de sens. Plus de 7 millions de photorécepteurs sont indispensables à la bonne acuité visuelle. Par comparaison, l'organe de l'audition mammalien, l'organe de Corti, ne compte que 15000 cellules réceptrices des sons, ce qui fait de lui, l'une des structures les plus remarquables. Cet organe à l'architecture caractéristique se situe dans le canal cochléaire au niveau de l'oreille interne des mammifères et de par son arrangement cellulaire hautement ordonné, il est sans doute l'un des systèmes les plus étudiés.

La plupart des études sur l'organe de Corti ont été pratiquées chez la souris (Ruben 1967 ; Sher, 1971) mais d'autres mammifères tels le rat (Abhouh et al., 1994 ; Lenoir et al., 1980 ; Malgrange et al., 2002 ; Mu et al., 1997 ; Pirvola et al., 1990 ; Zine and Romand, 1996), la gerbille (Arjmand et al., 1988 ; Spicer and Schulte, 1994), le cochon d'Inde (Pujol and Hildind, 1973 ; Thorn, 1975), le hamster (Kaltenbach and Falzorano, 1994), la chauve souris (Vater and al., 1997), le chat ou encore le chien (Pujol and Hilding, 1973) ont été utilisés comme modèle expérimental. Malgré la complexité de cet organe, son arrangement et sa structure semblent similaire au sein des mammifères euthériens (Pujol et al., 1998). Cependant, notre connaissance de son développement reste très parcellaire. En particulier, la mise en place du cytosquelette au sein des cellules de l'organe de Corti durant son développement a fait l'objet de peu d'études et de nombreuses zones d'ombres restent à éclaircir.

1) L'oreille

Les principaux éléments structuraux de l'appareil audiovestibulaire sont l'oreille externe, l'oreille moyenne et l'oreille interne.

L'oreille externe permet la réception des ondes sonores, canalisées vers la membrane tympanique. Elle est essentiellement constituée de l'auricule (pavillon) et du conduit auditif externe (Wheater et al., 2001).

L'oreille moyenne, remplie d'air, permet aux ondes percutant le tympan d'être converties en vibrations mécaniques par le biais de trois osselets (le marteau, l'enclume et

l'étrier). Ces vibrations sont transmises à la cavité remplie de liquide de l'oreille interne (Wheater et al., 2001).

2) Oreille interne

L'oreille interne est constituée d'une structure interconnectée remplie de liquide, le labyrinthe membraneux, engainé dans une portion osseuse, le labyrinthe osseux.

Le labyrinthe membraneux s'insère en plusieurs endroits sur le labyrinthe osseux mais il en reste séparé dans sa plus grande partie par un espace liquidien. Le fluide contenu dans le labyrinthe membraneux s'appelle l'endolymphe et celui contenu dans l'espace osseux périmembraneux s'appelle la périlymphe.

Le labyrinthe osseux peut être divisé en trois régions principales : le vestibule, les canaux semicirculaires et la cochlée (Fig. 1). Les canaux semicirculaires, au nombre de 3, s'insèrent en arrière du vestibule. La cochlée s'en détache en avant. Le vestibule et les canaux semicirculaires font partie de l'organe de l'équilibre.

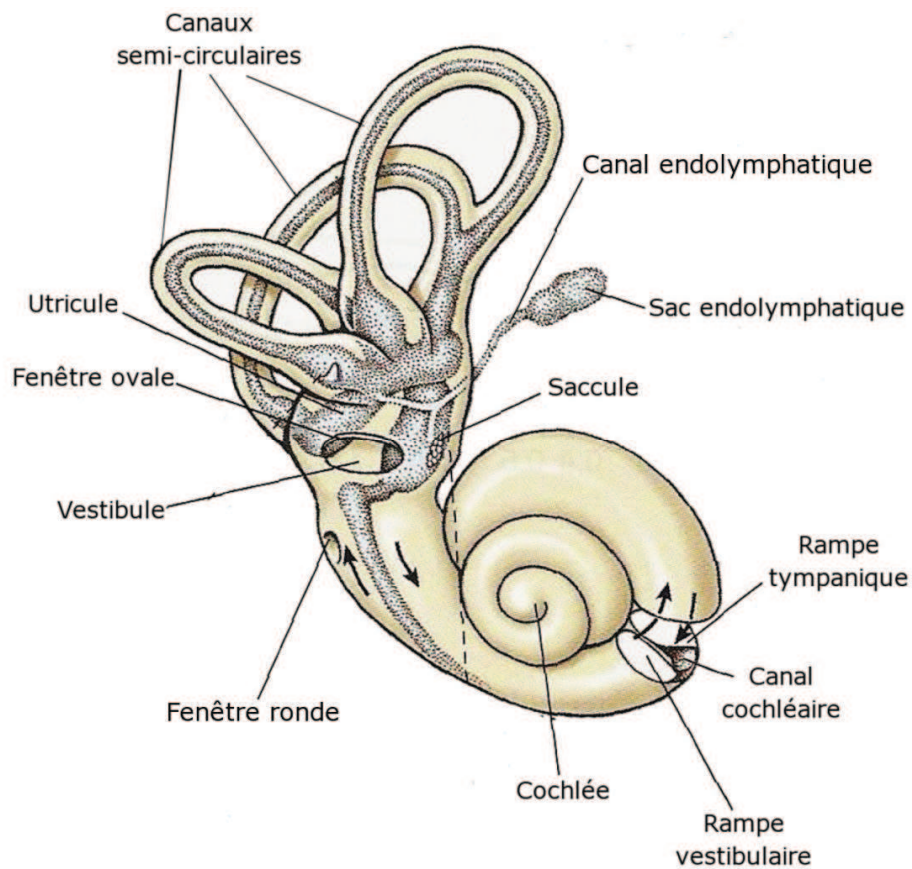


Figure 1. Représentation schématique de l'oreille interne des mammifères. Repris de Randall D., Burggren W., French K. 1999. Eckert Physiologie Animale, mécanismes et adaptations. 4^e ed. De Boeck université s.a., Paris, bruxelles

1. INTRODUCTION

La cochlée, développée à la partie antérieure du vestibule, occupe un espace conique, en forme de spirale, à l'intérieur de l'os temporal ; cette espace a grossièrement la forme d'une coquille d'escargot. Cette structure hélicoïdale, enroulée autour d'un axe central nommé la columelle ou *modiolus*, est formée de 3 canaux : le canal cochléaire, la rampe vestibulaire et la rampe tympanique (Fig. 2A). Ces deux dernières sont en communication par une ouverture appelée l'hélicotrème. L'organe de Corti occupe la partie centrale de la membrane basilaire représentant la partie externe du plancher du canal cochléaire (Fig. 2B) (Raphael and Altschuler, 2003). Le canal cochléaire est rempli d'endolymphe alors que les deux autres rampes sont remplies de périlymphe. Les différences fondamentales entre ces deux liquides résident dans leurs concentrations ioniques. L'endolymphe est riche en potassium (170mM) mais pauvre en ions Na^+ (1mM) alors que la périlymphe est riche en sodium (140mM) mais pauvres en ions K^+ (5mM) (Couloigner et al., 2004). Le canal cochléaire est séparé de la rampe vestibulaire par la membrane de Reissner alors que la membrane basilaire le sépare de la rampe tympanique.

3) L'organe de Corti

L'organe de Corti est une structure épithéliale très spécialisée contenant des cellules sensorielles qui convertissent l'énergie des vibrations en énergie électrochimique, provoquant une excitation des récepteurs sensoriels auditifs (Wheater et al., 2001).

Il est constitué de deux types cellulaires principaux, les cellules sensorielles et les cellules de soutien. Sans nul doute, les cellules sensorielles sont les pierres angulaires de cette structure dont nous distinguons 2 types, les cellules sensorielles internes et externes. Parmi les cellules de soutien, 4 types différents peuvent être distingués, depuis la partie interne vers la partie externe : les cellules de soutien internes (cellules phalangeaires), les cellules piliers internes et externes et les cellules de soutien externe (cellules de Deiters).

a) Les cellules sensorielles

Les cellules sensorielles internes (IH) transmettent les informations au cerveau par le nerf auditif (Raphael and Altschuler, 2003). Elles sont au nombre de 3500 par cochlée (Raphael and Altschuler, 2003), en forme de poire et sont disposées sur une seule rangée.

1. INTRODUCTION

Ces cellules sont entourées de divers types de cellule de soutien, les cellules piliers internes (sur la face latérale externe), les cellules phalangeaires et les cellules bordantes (sur la face latérale interne). Elles sont associées les unes aux autres par des jonctions de compartimentage et des desmosomes (Raphael and Altschuler, 2003). Au niveau apical, une table épaisse, la plaque cuticulaire, supporte deux rangées de stéréocils baignant dans l'endolymphe et sont soutenus par des faisceaux de microfilaments d'actine (Raphael and Altschuler, 2003) (Fig. 3). Au niveau du pôle basal, des fibres nerveuses afférentes et efférentes viennent s'y attacher. Les IH sont positionnées sur une zone arquée de la membrane basilaire qui est enchâssée au niveau de la lame spirale osseuse. Ainsi, la membrane basilaire est immobile dans cette région et le corps des IH ne vibre pas lors de la réponse à une stimulation (Raphael and Altschuler, 2003).

Les cellules sensorielles externes (OH) servent à augmenter la sélectivité et la sensibilité de la cochlée (Raphael and Altschuler, 2003; Kaltenbach and Falzarano, 1994). Elles sont réparties sur 3 rangées et sont ainsi plus nombreuses que les IH (entre 12000 et 15000) (Raphael and Altschuler, 2003). De forme cylindrique, elle présente les mêmes caractéristiques que les IH. Le domaine apical inclut les stéréocils disposés en W ainsi que la présence d'une plaque cuticulaire servant d'ancrage à ceux-ci (Leonova and Raphael, 1999), et la base ainsi que le corps sont positionnés dans une coupe fournie par une cellule de Deiters (Fig. 3).

De plus, les OH sont entourées par de vastes espaces intercellulaires remplis d'un fluide, appelés espaces de Nuel, qui communiquent avec le tunnel de Corti. Ces deux structures contiennent de la cortilymphe, dont la composition ionique est proche de la périlymphe c'est-à-dire avec une concentration relativement haute de sodium mais basse de potassium (Raphael and Altschuler, 2003). Les espaces de Nuel sont mis hors-contact de la surface de l'organe de Corti par les expansions des OP et des cellules de Deiters (D). Le domaine apical de chaque OH est ainsi en contact avec quatre cellules de soutien différentes (Raphael and Altschuler, 2003).

b) Les cellules de soutien

Les cellules piliers (PC) sont des cellules spécialisées dont les pôles basaux recouvrent le plancher du tunnel de Corti. En effet, lors de leur différenciation, une structure de forme triangulaire en coupe transversale bordée par les PC se forme et correspond au tunnel de Corti. Celui-ci donne une rigidité à l'ensemble et représente l'axe de l'organe de Corti séparant celui-ci en sa partie interne vers la columelle (greater epithelial ridge, GER) et externe vers la strie vasculaire (lesser epithelial ridge, LER) (Ito, Spicer et al., 1995). Les PC se prolongent par une fine extension légèrement dilatée à leur pôle apical. Une des caractéristiques est la présence sur toute leur longueur d'un assemblage organisé de tonofilaments et de microtubules (Raphael and Altschuler, 2003). De fins ponts transversaux unissent les filaments d'actine et les microtubules qui, au niveau de la tête et de la base des cellules piliers, s'épanouissent en éventail. C'est ce cytosquelette organisé qui permet aux PC d'acquérir une rigidité exceptionnelle. La jonction apicale entre les têtes des cellules piliers internes (IP) et des cellules piliers externes (OP) affichent un des plus vaste complexe de jonctions de type « adherens ». Etant donné qu'elles sont légèrement évasées, le nombre d'IP est d'environ 6000 (Raphael and Altschuler, 2003). Les OP sont en contact avec les OH situées du côté opposé au tunnel de Corti formé avec l'IP voisine. Les OP sont cependant moins nombreuses 4000 (+/- 12000/3) (Raphael and Altschuler, 2003).

Le pied des OP penche dans la direction opposée aux IP (Raphael and Altschuler, 2003). Ainsi, elles ne sont en contact que par leurs extrémités basales et apicales. De plus, les IP forment une barrière continue séparant le tunnel de Corti des cellules de l'organe provenant du GER.

Dans la partie interne, les cellules phalangeaires (Ph) supportent la rangée d'IH. Ces cellules séparent les IH entre elles mais elles les isolent également des cellules piliers internes.

Les cellules de Deiters (D) sont constituées de trois compartiments distincts : le corps, le pied et la tête apicale en plateau appelé le processus « phalangeal ». La région inférieure est la principale, avec sa base en continuité avec la membrane basilaire. La partie supérieure est incurvée comme une coupe pour accommoder et soutenir la portion basale et latérale

des OH. Le pied s'étend du corps vers la membrane basilaire avec un angle oblique, et se termine avec la tête. L'angle formé par le pied est toujours tourné vers l'apex de la cochlée et vers le côté latéral de l'organe de Corti. Ainsi, la D n'est pas en contact avec une seule OH, celle qui occupe le « siège », mais avec quatre OH différentes (Raphael and Altschuler, 2003 ; Kelley et al., 2007) (Fig 4).

De plus, les cellules de Deiters présentent une caractéristique ultrastructurale peu commune au niveau du cytosol apical. En effet, elles exhibent une structure unique, un complexe en rosette formé par un matériel dense aux électrons entouré par un abondant réticulum endoplasmique lisse (Spicer and Schulte, 1993; Nakazawa et al., 1995 ; Spicer et al., 1999).

C) Cellules et structures adjacentes à l'organe de Corti

De part et d'autre de l'organe de Corti, nous retrouvons le sillon interne et le sillon externe. Le sillon interne est recouvert d'un épithélium simple cubique ou pavimenteux. Le sillon externe est composé de types cellulaires différents.

Au niveau du sillon interne, la cellule bordante (Bo) est en contact avec la cellule sensorielle interne, sur sa face latérale interne, et avec la membrane basilaire. De plus, au niveau baso-latéral, elle est en contact avec la cellule phalangeaire.

Au niveau du sillon externe, le premier type cellulaire sont les cellules tectales (T) (Malgrange et al., 2002 ; Rueda et al., 1993) supportées par les cellules sous-tectales (S), en contact avec la membrane basilaire (Malgrange et al., 2002).

Ensuite, nous retrouvons les cellules de Hensen (H) situées à côté des T et des S. Plus hautes et plus volumineuses que ces dernières, elles sont disposées sur 3-4 rangées et sont en contact avec la membrane basilaire.

En contact avec ces H, les cellules de Boëttcher sont de formes cubiques et sont en contact avec la membrane basilaire. Celles-ci sont recouvertes par les cellules de Claudius également de forme cubique.

A l'extérieur du sillon externe se trouve la strie vasculaire (SV) composé de 3 types cellulaires : les cellules marginales, les cellules intermédiaires et les cellules basales. Seules les premières sont en contact avec la lumière du canal cochléaire. Elle jouerait un rôle dans l'absorption et la sécrétion du liquide endolymphatique (Spicer and Schulte, 1998).

Dans le tissu conjonctif sous-jacent à l'organe de Corti, nous trouvons un vaisseau sanguin, le vaisseau spiral.

4) Développement de la cochlée

a) Développement du canal cochléaire

Chez les mammifères, l'oreille interne se développe à partir de la placode otique située dans la portion latérale de la tête et formée dès le 8,5^e jour embryonnaire (E8,5) chez la souris. La placode s'invagine pour former la cupule otique qui donnera par la suite la vésicule otique (otocyste). Des neuroblastes se séparent de la cupule otique pour former le ganglion cochléo-vestibulaire. La vésicule otique donne naissance à toutes les autres structures de l'oreille interne y compris les épithéliums sensoriels contenant les cellules sensorielles.

Chez la souris, le canal cochléaire peut déjà être identifié au 11,5^e jour embryonnaire (E11,5) comme une évagination de la région ventromédiane de l'otocyste (Hensen, 1863 cité par Kelley and Bianchi, 2001). A E12,5, le canal se prolonge pour former un tube ressemblant à une demi-boucle. Au cours du développement, le canal s'allonge et s'enroule en une spirale qui, à E17,5, fera 1^{1/2} tour entre sa base et son apex. La spirale n'est pas écrasée sur elle-même : l'apex se situe ventralement à une distance approximative de 1,3 mm de la base (Lim and Anniko, 1985).

Les différences dans la composition épithéliales des faces dorsale et ventrale du canal cochléaire en formation sont déjà visibles à E12,5 (Anniko, 1983 ; Lim and Anniko, 1985). Les épithéliums de la face dorsale du canal, à l'origine de l'organe de Corti, du sillon interne (également nommé sulcus interne), du sillon externe (également nommé sulcus externe) et du limbe spiral comportent déjà 5 à 6 couches de cellules. Quant à la face ventrale qui deviendra la membrane de Reissner, elle en compte 2 ou 3.

1. INTRODUCTION

Ruben (1967), par injection de thymidine tritiée chez la souris, a étudié le cycle cellulaire des différents types cellulaires de l'organe de Corti et des régions voisines du canal cochléaire. Il a constaté que les cellules de l'organe de Corti (IH, OH, cellules piliers, cellule phalangée et cellules de Deiters) et du sillon externe (cellules tectales, cellules sous-tectales, cellules de Hensen, cellules de Boëttcher et cellules de Claudius) se renouvellent en quelques jours. Leur multiplication commence à E12 dans la région apicale du canal cochléaire, avec un pic entre E13 et E14 et termine à E16 dans la région basale du canal cochléaire. Au niveau du sillon interne, par contre, la prolifération ne débutera pas avant E16, ce qui suggère une différence fondamentale dans les mécanismes qui régulent le cycle cellulaire des cellules situées soit dans la partie interne (« modiolar »), soit dans la partie externe (« striolar ») de la région dorsale du canal cochléaire.

Dans le canal cochléaire en formation, certaines cellules dégènèrent au cours du développement de l'oreille interne du rat à partir d'E12 jusqu'E16. Cette mort cellulaire augmente jusqu'E14 parallèlement au renouvellement cellulaire décrit par Ruben (1967) au moment de l'observation des dernières mitoses puis diminue jusque E16 (Marovitz et al., 1976). Chez la souris, d'E17,5 jusqu'à la naissance, cette dégénérescence cellulaire se focalise à des endroits particuliers (Nishizaki et al., 1998). Notons que la durée de gestation est plus longue chez le rat que chez la souris : elle est en moyenne de 22 jours et 19 jours, respectivement.

b) Développement de l'organe de Corti

Le développement de l'organe de Corti est complexe et les mécanismes moléculaires qui le sous-tendent sont encore peu connus (Mu, Chardin et al., 1997; Kelley, 2007).

Chez la souris, l'organe de Corti se développe entre E12,5 et E14,5 à partir d'une bande de cellules épithéliales situées sur la face dorsale du canal cochléaire. Cette bande de cellules engagée dans le développement de l'organe de Corti a été également appelée zone de non prolifération cellulaire car elle est spécifiquement marquée par p27^{Kip1}, un inhibiteur de kinase cycline-dépendante (Chen and Segil, 1999). Cependant, à ce stade embryonnaire, l'organe de Corti n'est pas visible morphologiquement.

1. INTRODUCTION

Au cours du développement, la différenciation cellulaire s'opèrerait en une vague qui se déplacerait le long de l'axe base-apex (Kelley and Bianchi, 2001). Toutefois, la nature de la première cellule à se différencier reste sujette à controverse. L'examen de la mise en place des stéréocils par l'utilisation en microscopie à fluorescence de marqueurs tels que la phalloïdine, un marqueur des microfilaments d'actine, ainsi que par l'observation au microscope électronique à balayage, a permis de suggérer que les premières cellules qui présenteraient un signe de différenciation seraient les IH à E18 chez le rat (Zine and Romand, 1996). Récemment, chez la même espèce, l'analyse systématique de l'épithélium dorsale de la cochlée entre E15 et E19 à l'aide d'une méthode de détection des polysaccharides ainsi que par l'étude au microscope électronique à transmission, a révélé que les IP à E17 seraient les premières cellules identifiables de l'organe de Corti (Thelen et al., 2009).

De plus, l'étude du développement des stéréocils chez le rat a montré que les OH ne commenceraient leur différenciation qu'à partir de E20 (Romand et al., 1993 ; Zine and Romand, 1996). La fin de la maturation du cytosquelette des stéréocils des cellules sensorielles serait atteinte vers le 11^{ème} jour post-natal (P11) d'abord par les OH (Vago et al., 1996). Entre P4 et P20, la maturation des IH et des OH est caractérisée par une diminution d'organelles dans leur cytoplasme (Roth and Bruns, 1992). Les analyses quantitatives ont révélé un schéma unique de développement de la longueur et de la largeur des OH ainsi que de la longueur de leurs stéréocils (Roth and Bruns, 1992). Peu de temps après la naissance, ces structures possédaient une taille presque constante le long du canal cochléaire mais avec l'âge, les cellules deviennent plus petites à la base de la cochlée et plus large à l'apex (Roth and Bruns, 1992).

Les étapes les plus évidentes de la différenciation de l'organe de Corti s'opèrent pendant le développement postnatal. Ainsi chez le rat, la formation du tunnel de Corti (entre les cellules piliers), des espaces de Nuel (entre les cellules de Deiters et leur OH respective) et l'apparition de filaments dans les cellules de soutien s'effectuent entre P8 et P12 (Ito et al., 1995 ; Spicer et al., 1995).

Finalement, certaines études (Roth and Bruns, 1992 ; Rueda al., 1996) ont indiqué que l'organe de Corti ne serait vraiment mature que 10 à 14 jours après le début de la fonction auditive. Ainsi par exemple, la membrane tectoriale est parfaitement constituée au début de l'audition (entre P10 et P12) alors que la longueur et l'épaisseur de la membrane basilaire ainsi que les cellules de Hensen, de Claudius et de Boëttcher se différencient jusqu'à P24.

5) Le cytosquelette au niveau des cellules de l'organe de Corti

Les trois types de filaments cellulaires du cytosquelette ont été mis en évidence dans les cellules de l'organe de Corti : Les microtubules, les microfilaments et les filaments intermédiaires.

a) Microtubules

Dans l'organe de Corti mature de gerbille, 5 des 7 isotypes de la tubuline β sont présents mais pas au niveau de chaque type cellulaire. En effet, les IH ne contiennent que la $\beta 1$ et la $\beta 2$, alors que les OH ne referment que la $\beta 1$ et la $\beta 4$. Seules les $\beta 2$ et $\beta 4$ ne sont décelées que dans les cellules piliers, alors que la présence de $\beta 1$, 2 et 4 a été détectée dans les cellules de Deiters (Hallworth and Luduena, 2000 ; Jensen-Smith et al., 2003).

Au cours du développement, la première apparition de tubuline s'observe au 0^e jour postnatal (P0) au niveau de l'IH pour s'étendre vers les OH à P2. Par la suite, la tubuline apparaît dans l'IP, à partir de P3, puis dans l'OP, à partir de P6 et enfin dans les D à partir de P9, chez la gerbille (Raphael et al., 1994; Kuhn and Vater, 1995 ; Vago et al., 1996 ; Hallworth et al., 2000).

b) Microfilaments d'actine

Dans l'organe de Corti de l'adulte, l'actine β a été détectée au niveau des OP ainsi que dans la plaque cuticulaire et les stéréocils des IH et des OH (Furness et al., 2005). Quant à l'actine gamma, elle a été majoritairement décelée au niveau des murs latéraux des cellules sensorielles (Anniko and Arnold, 1995) mais aussi au niveau du processus « phalangeal » des cellules de Deiters (Nakazawa et al., 1995).

1. INTRODUCTION

Seules deux études se sont intéressées à la distribution de l'actine dans l'organe de Corti pendant son développement. En effet, Kuhn et Vater (1995, 1996) ont montré que, chez la chauve-souris et la gerbille, l'actine-F est révélée entre P3 et P5 au niveau des processus « phalangeal » des D et des têtes des PC alors que sa présence au niveau des stéréocils s'observait dès E22. Ensuite, à P9, avec la formation du tunnel de Corti, l'actine-F apparaissait au niveau du pôle basal des D ainsi qu'aux niveaux basal et apical des PC. A P12, seules les D et les stéréocils étaient marqués. Enfin, entre P15 et P20, un marquage intense était noté dans les PC alors que celui des D s'amointrissait. Il est important de constater que malgré des fonctions auditives différentes entre la gerbille et la chauve-souris, la distribution de l'actine-F dans les cellules de soutien était similaire.

c) Filaments intermédiaires

Outre les filaments intermédiaires typiques des cellules neuronales, seuls deux constituants des filaments intermédiaires ont été investigués au niveau du canal cochléaire : les cytokératines et la vimentine.

Dans l'organe de Corti mature, Yamasoba and Kondo (2006) ont montré que seules les cellules de Deiters et les cellules piliers sont positives pour la vimentine alors que toutes les cellules de soutien sont marquées avec un anticorps dirigé contre les cytokératines 5, 6 et 8. La distribution des cytokératines a également été étudiée chez le rat au cours de la mise en place de l'organe de l'audition, entre E12 et P40, à l'aide d'un anticorps reconnaissant les cytokératines 5, 6, 7 et 8 (Bauwens et al., 1991 ; Kuijpers et al., 1992). Ces cytokératines ont été localisées dans toutes les cellules de la lignée épithéliale, à E12 et E15, dans les cellules de la membrane de Reissner, de la strie vasculaire et du LER, à E18, et au niveau de la membrane de Reissner, de la strie vasculaire et du pôle basal des cellules de soutien, à P1. Enfin, entre P4 et P40, une positivité a été observée dans toutes les cellules de soutien ainsi qu'au niveau de la strie vasculaire, de la membrane de Reissner et du sillon externe. De plus, la vimentine a été détectée dans les mêmes types cellulaires que ceux décrits pour les cytokératines au cours du développement (Kuijpers et al., 1992), suggérant une co-localisation de ces deux protéines des filaments intermédiaires chez le rat.

6) Objectifs

Si l'organisation structurale de l'organe de l'audition chez les mammifères adultes a été bien décrite, son développement est encore mal connu à l'heure actuelle. En particulier, très peu d'études ont été consacrées à la différenciation des cellules sensorielles et des divers types de cellules de soutien au sein de l'organe de Corti pendant son développement. Ainsi, notre connaissance de la mise en place du cytosquelette dans ces différentes cellules hautement spécialisées de l'organe de l'audition reste largement parcellaire et incomplète.

À quel stade important le cytosquelette des cellules de soutien commence-t-il son développement ? Quels sont les protéines qui participent au développement de ce cytosquelette ? Y a-t-il des différences entre les constituants du cytosquelette des cellules de soutien et ceux des cellules sensorielles ? Ce sont des exemples de questions qui restent sans réponses précises.

Afin de tenter d'y répondre, nous allons utiliser une approche immunocytologique sur des cryocoupes confectionnées dans des cochlées entières entre E18 et P15 chez le rat. Afin d'appréhender la mise en place des microtubules dans les cellules de l'organe de Corti, nous ferons appel à un anticorps anti-tubuline β IV, un isotype de la tubuline β décrit chez la gerbille adulte et spécifique des cellules de soutien (Roach et al., 1998 ; Hallworth and Luduena, 2000). Pour l'étude des filaments intermédiaires dans les cellules épithéliales du canal cochléaire, nous utiliserons un anticorps anti-cytokératine à large spectre (CKPan) ainsi qu'un anticorps reconnaissant la cytokératine 8 (CK8), une cytokératine typique des épithéliums non stratifiés dont la présence a été reportée dans plusieurs travaux (Broekaert, 1993 ; Ameen et al., 2001). Enfin, nous emploierons également un anticorps anti-vimentine, une protéine caractéristique des filaments intermédiaires des cellules d'origine mésodermique, qui a déjà été détectée dans l'organe de Corti par certains auteurs (Katsumoto et al., 1990 ; Sarria et al., 1992).

2. MATERIEL ET METHODES

1) Matériel

a) Matériel biologique

Nous avons analysé des organes de Corti prélevés sur d'une part, des embryons de rats Wistar (fournies par l'animalerie centrale de l'Université de Liège) après différents temps de gestation et d'autre part, des individus post-nataux. Le jour 0 de la gestation (E0) correspond au moment où la ratte est mise en présence d'un mâle. La mise à mâle dure environ 12 heures. Le jour 0 après la naissance (P0) correspond au moment où l'individu naît.

b) Prélèvement des cochlées

Les rattes gestantes datées sont euthanasiées par placement dans une cloche où l'air est progressivement remplacé par du CO₂. Les embryons sont retirés de l'utérus et transférés dans une boîte de pétri contenant un tampon phosphate salin (PBS : 154mM NaCl ; 1mM KH₂PO₄ ; 3mM Na₂HPO₄ ; pH 7,2). Les individus postnataux datés sont anesthésiés et décapités. Sous une loupe binoculaire, les cochlées sont retirées de la calvaria au moyen de pinces brucelles. Les cochlées sont ensuite fixées.

2) Méthodes

a) Préparation des cochlées pour l'observation au microscope confocal à balayage laser

Une fois prélevées, les cochlées sont directement plongées dans un liquide fixateur, du formaldéhyde dilué à une concentration 2% ou 4% dans un tampon phosphate de sodium 0,1M (pH 7,4). La fixation est réalisée à température ambiante pendant 30 minutes à 1 heure. Les cochlées sont ensuite rincées dans le tampon phosphate pendant 10 min à température ambiante. Après ce rinçage, les cochlées seront, si nécessaire, transférées dans un bain d'EDTA 2% dans du PBS pendant 1 nuit sous légère agitation. Le lendemain, un second rinçage au tampon phosphate de 10 minutes est obligatoire avant d'être imprégnées pendant 10 minutes à 37°C par de la gélatine dilué à une concentration 5% dans le tampon phosphate. Les cochlées sont ensuite progressivement ramenées à température ambiante et plongées dans 5 bains successifs d'une solution de saccharose concentré à 30% dans le tampon phosphate. Chacun des 5 bains dure 20 minutes et s'effectue à température

2. MATERIEL ET METHODES

ambiante. Les cochlées sont ensuite enrobées par du O.C.T. Compound (VWR International Ltd., Poole, England) et plongées dans un bain d'isopentane refroidi à une température de -70°C.

Des cryosections d'une épaisseur de 12 à 14 µm sont réalisées sur les blocs de O.C.T. Compound congelés au moyen d'un cryostat (Leica CM3050 S).

b) Immunohistochimie

i. Immunomarquages sur cryosections

Les cryosections sont placées dans un porte lame et sont séchées à 30°C durant 30 à 40 minutes. Elles sont ensuite rincées dans un tampon phosphate salin PBS (140mM NaCl ; 2,6mM KCl ; 1,5mM KH₂PO₄ ; 16mM Na₂HPO₄ ; pH 7,4). Elles sont ensuite perméabilisées avec une solution de Triton-X100 dilué à une concentration de 1% dans du PBS. Cette étape est réalisée à une température ambiante pendant 10 minutes. Les cryosections sont ensuite rincées dans du PBS avant d'être plongées pendant 30 minutes à 37°C dans une solution bloquante de sérum normal de chèvre dilué à une concentration de 10% dans du PBS. Les cryosections sont ensuite immergées durant 35 à 40 minutes à 37°C dans une solution contenant du sérum normal de chèvre dilué à une concentration de 5% dans du PBS, ainsi que l'anticorps primaire (voir section suivante). Les cryosections sont ensuite rincées dans du PBS et immergées dans une solution contenant l'anticorps secondaire (voir section suivante). Sur ces coupes, des triples marquages sont effectués. Premièrement, de la myosine VI (1/150 ; Sigma) ou du p27^{KIP1} (1/100 ; Sigma) est additionné à la solution contenant l'anticorps primaire et les cryosections sont immergées par une solution contenant du Dapi (1/50000 ; Sigma) (voir section suivante) avec de l'eau pure en fin de marquage pendant 15 minutes à 37°C. Les cryosections sont ensuite rincées dans de l'eau pure et montées entre lames et lamelles en présence de Citifluor (Laborimpex, Bruxelles, Belgium).

Les coupes témoins évitent les passages dans la solution contenant l'anticorps primaire.

ii. Anticorps primaires

Les anticorps primaires et les dilutions utilisées sont les suivantes :

- Anti-tubuline β IV produit chez la souris : 1/100 (Sigma Aldrich)
- Anti-vimentine (clone V9) produit chez la souris : 1/100 (Sigma Aldrich)
- Anti-cytokératine pan (CK 1, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18, et 19) produit chez la souris : 1/100 (Sigma Aldrich)
- Anti-cytokératine 8 produit chez le poulet : 1/100 (Abcam)
- Anti-myosine VI produit chez le lapin : 1/150 (Sigma Aldrich)
- Anti-p27^{Kip1} produit chez la souris : 1/100 (Sigma Aldrich)

iii. Anticorps secondaire

Les anticorps secondaires et les dilutions utilisées sont les suivantes :

- Alexa Fluor 488 goat anti-mouse ; 1/250 (Molecular Porbos, Leiden, The Netherlands) ; maximum d'excitation/d'émission du fluorochrome: 495/519 nm ;
- Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit ; 1/250 (Molecular Porbos, Leiden, The Netherlands) ; maximum d'excitation/d'émission du fluorochrome: 590/617 nm.
- Alexa Fluor 594 goat anti-chicken ; 1/250 (Molecular Porbos, Leiden, The Netherlands) ; maximum d'excitation/d'émission du fluorochrome: 590/617 nm.

iv. Marqueur nucléaire

Le Dapi ou 4',6' Di Amidino-2-Phényl Indole est une molécule fluorescente capable de se lier fortement à l'ADN, ce qui permet de détecter et quantifier l'ADN grâce à un microscope à fluorescence. La contre coloration permet de rendre visible le noyau (couleur bleu) sous microscope à fluorescence.

c) Observation de cryosections de cochlées au microscope confocal à balayage laser.

L'observation des immunomarquages sur cryosections s'est faite à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser (IX71 ; Olympus). Ce microscope est équipé de trois lasers ainsi que d'une motorisation dans le plan Z permettant la réalisation de plusieurs séries de sections optiques. La motorisation, le système de balayage des lasers et la numérisation des images

2. MATERIEL ET METHODES

sont contrôlés par une station informatique. L'ensemble du processus d'acquisition est piloté via l'interface informatique FV10-ASW 1.7 Viewer.

Les coupes sont observées via l'objectif à immersion d'huile 60x. Les sections optiques dans le plan Z sont collectées avec un pas irrégulier afin d'obtenir plus ou moins 13-14 images par laser et une vitesse de balayage moyenne (12,5 μ secondes/pixel pour une image 640*640).

Les sections optiques sont analysées et traitées avec les logiciels ImageJ 1.34s (<http://rbs.info.nih.gov/ij/>) et OLYMPUS FLUOVIEW 1.7b Viewer.

3. RESULTATS

Afin de mieux définir la répartition spatiotemporel des différentes protéines du cytosquelette au cours du développement de l'organe de Corti chez le rat, nous avons réalisé des immunomarquages sur des cryosections de cochlées entières d'embryons de rats âgés de 18 à 22 jours et d'individus postnataux âgés de 0 à 15 jours. Nous avons utilisé les anticorps anti-tubuline β IV, anti-vimentine, anti-cytokératine pan (CK 1, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18 et 19) et anti-cytokératine 8. Afin de mieux cerner les différents types cellulaires de l'épithélium auditif embryonnaire et postnatal, des doubles marquages ont été réalisés soit avec la myosine VI, marqueur précoce et typique des cellules sensorielles, soit avec p27^{kip1}, un inhibiteur de kinase cycline-dépendante faisant partie de la famille CIP/KIP, marquant les cellules de soutien ainsi que leur noyau présent dans la zone de non-prolifération cellulaire (ZNPC). Les noyaux cellulaires sont marqués par le Dapi, molécule fluorescente capable de se lier fortement à l'ADN.

Seuls les organes de Corti situés dans la région basale du canal cochléaire sont observés dans cette étude.

1) Embryon de rat de 18 jours

A E18, nous constatons qu'aucune cellule du canal cochléaire n'est positive avec l'anticorps anti-tubuline β IV (Fig. 5B). À proximité du vaisseau spiral, seule une cellule de l'épithélium dorsal du canal cochléaire est positive avec l'anticorps anti-myosine VI. Celle-ci correspond à la cellule sensorielle interne, IH (Fig. 5A).

Malgré un très faible marquage, nous observons que certaines cellules du LER et du GER ainsi que l'épithélium de la future membrane de Reissner sont marqué par l'anticorps anti-vimentine (Fig. 5E).

A ce stade du développement embryonnaire, une partie des cellules du LER et le pôle apical de certaines cellules de soutien de l'organe de Corti interne ainsi que l'épithélium de la strie vasculaire et de la future membrane de Reissner sont clairement marqués avec l'anticorps anti-cytokératine pan (Fig. 5H).

Nous montrons également que toutes les cellules de l'épithélium dorsal de la cochlée sont positives avec l'anticorps anti-cytokératine 8. Dans une certaine mesure, nous remarquons

que certaines d'entre elles sont plus marquées que d'autres, à savoir les cellules du LER, de la strie vasculaire et de l'épithélium de la future membrane de Reissner. De plus, avec l'anticorps anti-cytokératine 8, nous avons procédé à un triple marquage avec le Dapi et l'anticorps anti-p27^{kip1} (Fig. 5I) et nous notons que seules les cellules de soutien sont marquées au niveau de leur noyau et de leur cytoplasme. Ainsi, seule une cellule du GER n'est pas marquée avec l'anticorps anti-p27^{kip1} ; elle semble correspondre à l'IH (Fig. 5K).

2) Embryon de rat de 19 jours

A ce stade du développement embryonnaire, nous avons pu voir qu'aucune cellule du canal cochléaire n'est positive avec l'anticorps anti-tubuline β IV (Fig. 6B). Les cellules positives avec l'anticorps anti-myosine VI peuvent être aisément identifiées comme étant les IH et les OH (Fig 6A).

Avec l'anticorps anti-vimentine, nous visualisons un marquage sur certaines cellules de l'organe de Corti externe et du sillon externe ainsi que sur les cellules de l'épithélium de la future membrane de Reissner et de la strie vasculaire (Fig. 6E).

Les cellules de l'organe de Corti externe et du sillon externe, de la strie vasculaire et de l'épithélium de la future membrane de Reissner sont aussi positives avec l'anticorps anti-cytokératine pan (Fig. 6H). Toutefois, les cellules de la strie vasculaire présentent un marquage plus intense.

Quant à la cytokératine 8, nous remarquons également que l'épithélium dorsal du canal cochléaire est positif (Fig. 6K). En effet, certaines cellules du sillon externe sont marquées de manière corticale. De plus, les cellules de l'épithélium de la future membrane de Reissner et de la strie vasculaire sont fortement positives avec cet anticorps.

3) Embryon de rat de 21 jours

Sur les cryosections marquées avec l'anti-tubuline β IV, nous observons qu'un seul type cellulaire de l'épithélium dorsal est marqué (Fig. 7C); il correspond à l'IH. De plus, toute la cellule est marquée de manière hétérogène (Fig. 7C').

Comme nous l'avons observé à E18, les cellules de l'organe de Corti externe et du sillon externe sont faiblement positives avec l'anticorps anti-vimentine (Fig. 7F). De plus, un marquage est présent au niveau de la strie vasculaire ainsi qu'au niveau de la membrane basilaire, notamment dans les cellules endothéliales du vaisseau spiral.

A ce stade du développement, nous pouvons noter que le nombre de cellules positives avec l'anticorps anti-cytokératine pan a diminué au niveau des cellules de l'organe de Corti externe et au niveau de certaines cellules correspondant au futur sillon externe (Fig. 7I). Par contre, le marquage de la strie vasculaire et de la future membrane de Reissner est toujours aussi intense.

A E21, beaucoup de cellules de l'épithélium dorsal du canal cochléaire sont positives avec l'anticorps anti-cytokératine 8, bien que l'intensité du signal soit variable suivant les cellules. Grâce à l'emploi de l'anticorps anti-p27^{kip1}, qui à ce stade du développement embryonnaire est un marqueur des cellules de soutien de l'organe de Corti (Fig. 7J), nous montrons que les cellules positives avec l'anticorps anti-cytokératine 8 correspondent à toutes les cellules de soutien de l'organe de Corti ainsi qu'aux H (Fig. 7L). Le marquage est essentiellement cortical pour les Ph et périnucléaire pour les D (Fig. 7L'). Enfin, les cellules de la strie vasculaire et de la future membrane de Reissner sont fortement marquées.

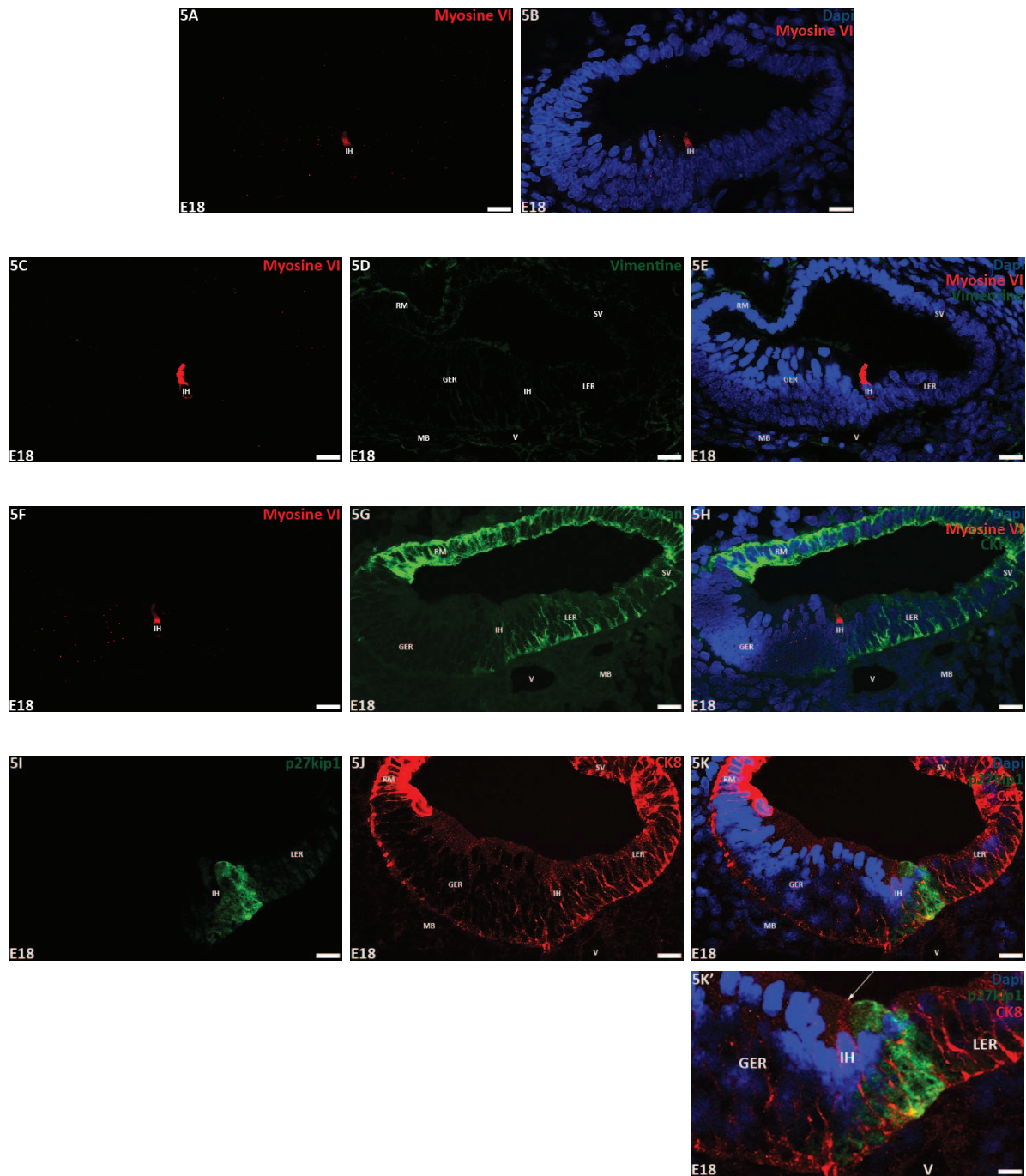


Figure 5. Mise en évidence de la myosine VI (A, C, E, F, H ; en rouge), de la vimentine (D-E ; en vert), de la cytokératine Pan (G-H ; en vert), de la cytokératine 8 (J-K ; en rouge) et de la p27^{Kip1} (I, K, K') sur des cryosections dans la partie basale du canal cochléaire au stade E18. Le noyau des cellules est détecté par le Dapi (en bleu). K' : Détail de K. Barres = 10 µm (A-K) et 5 µm (K'). GER : Grande crête épithéliale ; IH : Cellule sensorielle interne ; LER : Petite crête épithéliale ; MB : Membrane basilaire ; RM : Membrane de Reissner ; SV : Strie vasculaire ; V : Vaisseau spiral.

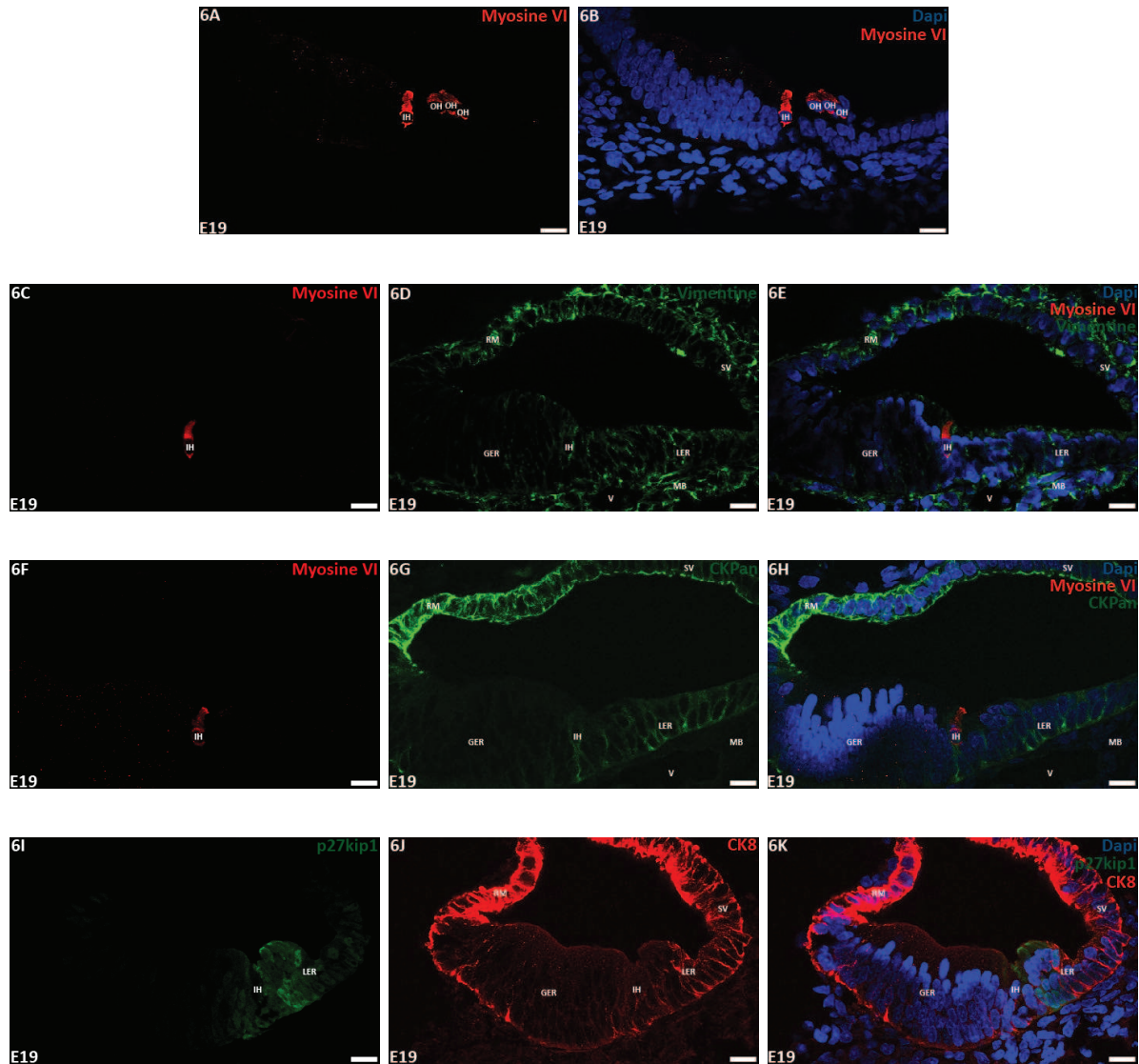


Figure 6. Mise en évidence de la myosine VI (A, C, E, F, H ; en rouge), de la vimentine (C-E ; en vert), de la cytokératine Pan (G-H ; en vert), de la cytokératine 8 (J-K ; en rouge) et de la p27^{Kip1} (I-K) sur des cryosections dans la partie basale du canal cochléaire au stade E19. Le noyau des cellules est détecté par le Dapi (en bleu). Barres = 10 µm. GER : Grande crête épithéliale ; IH : Cellule sensorielle interne ; LER : Petite crête épithéliale ; MB : Membrane basilaire ; OH : Cellule sensorielle externe ; RM : Membrane de Reissner ; SV : Strie vasculaire ; V : Vaisseau spiral.

3. RESULTATS

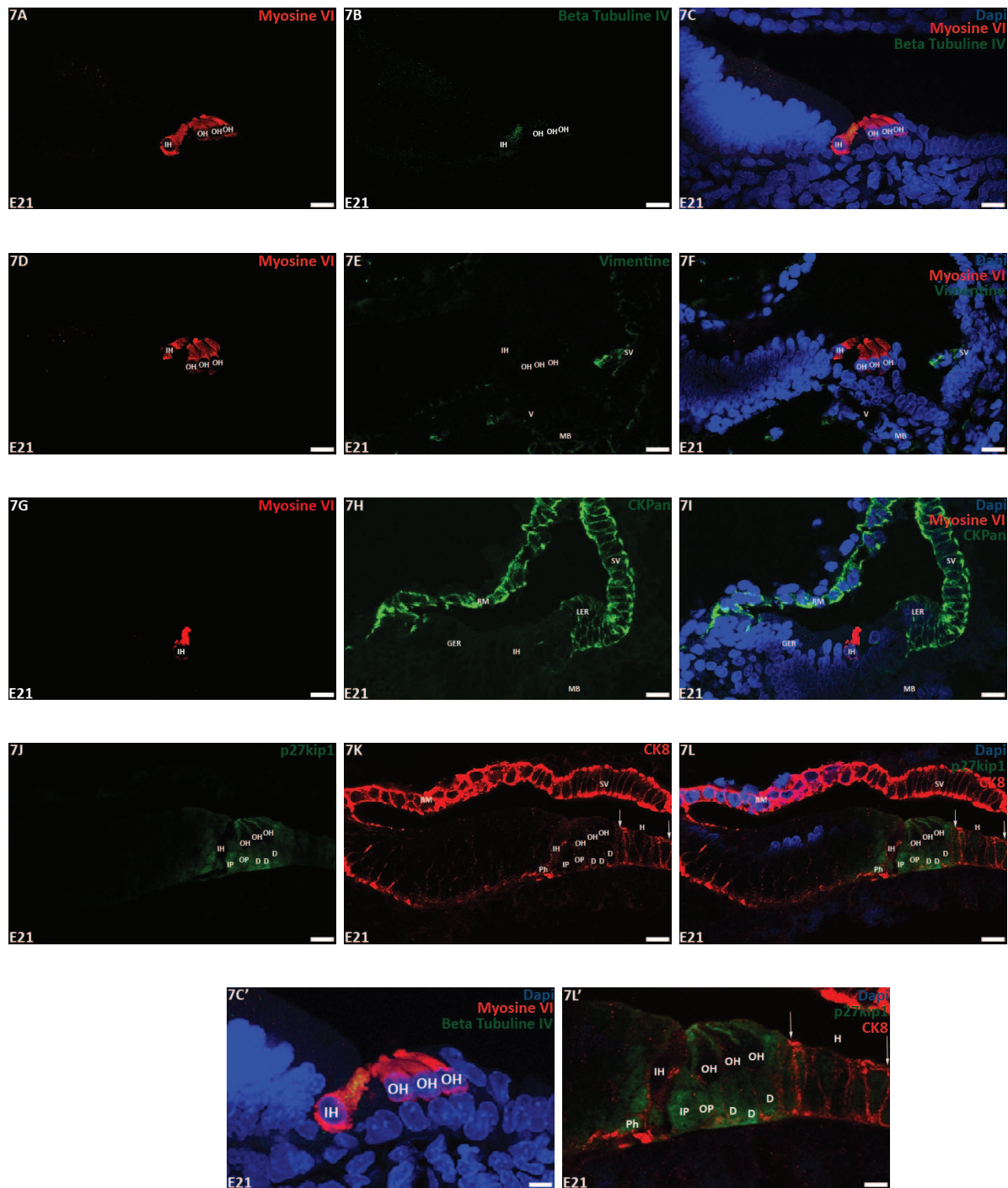


Figure 7. Mise en évidence de la myosine VI (A, C, C', D, F, G, I ; en rouge), de la tubuline β IV (B-C ; en vert), de la vimentine (E-F ; en vert), de la cytokératine Pan (H-I ; en vert), de la cytokératine 8 (K-L ; en rouge) et de la $p27^{Kip1}$ (J, L, L') sur des cryosections dans la partie basale du canal cochléaire au stade E21. Le noyau des cellules est détecté par le Dapi (en bleu). C' et L' : Détail de C et L respectivement. Barres = 10 μ m (A-K) et 5 μ m (C', L'). D : Cellules de Deiters ; GER : Grande crête épithéliale ; H : Cellules de Hensen ; IH : Cellule sensorielle interne ; IP : Cellule pilier interne ; LER : Petite crête épithéliale ; MB : Membrane basilaire ; OH : Cellule sensorielle externe ; OP : Cellule pilier externe ; Ph : Cellule phalangeaire ; RM : Membrane de Reissner ; SV : Strie vasculaire ; V : Vaisseau spiral.

4) Embryon de rat de 22 jours

En ce qui concerne la tubuline β IV, nous constatons qu'à E22, seule l'IH est positive, avec un marquage plus accentué au niveau du pôle apical (Fig. 8C).

Sur les cryosections marquées avec l'anticorps anti-vimentine, nous observons que la membrane basilaire, l'épithélium dorsal de la cochlée, plus précisément les cellules piliers, les cellules tectales, les cellules sous-tectales et les cellules de Hensen (Fig. 8F), et la membrane de Reissner (non illustrée sur les photographies) sont marqués avec cet anticorps.

Nous constatons qu'à ce stade du développement, des cellules positives avec l'anticorps anti-cytokératine pan peuvent être distinguées dans l'épithélium dorsal du canal cochléaire (Fig. 8I). Nous observons un marquage au niveau du pôle basal de la Ph et du pôle apical et basal de l'IP ainsi qu'au niveau des trois D sous la forme d'un filament apico-basal. Enfin, un signal intense est présent au niveau de l'épithélium de la membrane de Reissner et de la strie vasculaire (non illustrés sur les photographies).

A ce stade, nous remarquons que le pôle basal de la Bo, la périphérie nucléaire de la Ph, le pôle apical de l'IP et de l'OP, les D et la périphérie cellulaires des H sont positifs à la cytokératine 8 (Fig. 8L). Comme signalé aux stades précédents, l'épithélium de la strie vasculaire et de la membrane de Reissner (non illustrés sur les photographies) sont toujours marqués avec l'anticorps anti-cytokératine 8.

5) Rat de 0 jours

A P0, nous remarquons que le nombre de cellules marquées avec l'anticorps anti-tubuline β IV dans l'épithélium dorsal de la cochlée augmente (Fig. 9C). Le marquage des IH est identique à celui observé dans les mêmes cellules à E22 mais il est plus intense que celui des OH. De plus, des cellules de soutien sont positives avec cet anticorps. En effet, les IP présentent un marquage sous la forme d'un faisceau de filaments apico-médian. De même, la 2^e D est marquée au niveau de son pôle basal.

A la naissance, une positivité pour la vimentine est détectée au niveau du pôle basal de la Ph et de l'IP ainsi qu'au niveau de l'OP mais son marquage est plus hétérogène. De plus, nous observons un signal dans l'entièreté de la 2^e D, dans la région périnucléaire des deux autres D et dans la zone corticale des H (Fig. 9F). Enfin, les cellules de la strie vasculaire, de la membrane de Reissner (non illustrées sur les photographies) et de la membrane basilaire sont fortement marquées.

A P0, les cellules de la strie vasculaire et de la membrane de Reissner (non-illustrées sur les photographies), le pôle basal de la Bo et des trois D sont les seules à être positives avec l'anticorps anti-cytokératine pan (Fig. 9I).

Nous pouvons remarquer qu'à ce stade du développement le nombre de cellules marquées avec l'anticorps anti-cytokératine 8 diminue. En effet, au niveau de l'épithélium dorsal de la cochlée, seules la 3^e D et les H sont nettement positives (Fig. 9L). La strie vasculaire et l'épithélium de la membrane de Reissner sont très fortement marqués (non-illustrés sur les photographies).

6) Rat de 2 jours

Deux jours après la naissance, plusieurs types cellulaires de l'épithélium dorsal du canal cochléaire sont positifs avec l'anticorps anti-tubuline β IV, à savoir les cellules sensorielles, les IP et les D (Fig. 10C). Le marquage des IP se présente sous la forme d'un faisceau de filaments apico-médian tandis que celui des D est préférentiellement situé sur le contour nucléaire.

A l'aide de l'anticorps anti-vimentine, nous décelons un marquage au niveau du pôle basal de la Ph. Le pôle basal avec un prolongement baso-apical est également positif dans les 3 D. Un signal hétérogène est présent sur l'IP et l'OP (Fig. 10F). Enfin, les H, la membrane basilaire et l'endothélium du vaisseau spiral sont aussi positifs avec cet anticorps.

A P2, nous remarquons que certaines cellules de l'épithélium dorsal de la cochlée sont positives avec l'anticorps anti-cytokératine pan, à savoir le pôle basal de la Ph, le pôle basal et apical de l'IP, la 1^e et 2^e D de manière hétérogène et le pôle basal et la région

périnucléaire de la troisième D (Fig. 10I). Enfin, l'épithélium de la strie vasculaire est toujours fortement fluorescent (non illustré sur les photographies).

A ce stade du développement, nous pouvons noter que l'épithélium dorsal de la cochlée et ceux de la strie vasculaire et de la membrane de Reissner (non illustrés sur les photographies) renferment de la cytokératine 8. Concernant l'épithélium dorsal du canal cochléaire, le pôle basal de la Ph, et de la 1^e et 2^e D ainsi que le pôle basal et apical de la 3^e D et le pôle apical des T et des H sont marqués (Fig. 10L).

7) Rat de 4-5 jours

A P4-P5, nous constatons que les IH et les OH ne sont plus marquées avec l'anticorps anti-tubuline β IV (Fig. 11C). Par contre, concernant les IP, le faisceau de filaments apico-médian fluorescent à P2 s'est transformé en faisceau de filaments apico-basal.

A ce stade du développement postnatal, nous constatons que le pôle basal de l'IP et de l'OP est positif avec l'anticorps anti-vimentine ainsi que, dans une moindre mesure, les D et le pôle basal et la périphérie nucléaire de la Ph (Fig. 11F). De plus, nous remarquons que la membrane basilaire et l'endothélium du vaisseau spiral sont marqués par cet anticorps.

Quant à la cytokératine pan, nous observons sa présence au niveau des D et du pôle basal de la Ph. Un faible marquage est aussi visible dans le cytoplasme de l'IP et de l'OP (Fig. 11I). Par contre, l'intensité du marquage de l'épithélium de la future membrane de Reissner décroît comparée à celle observée à P2 (non illustré sur la photographie).

A P4-P5, certaines cellules de l'épithélium dorsal du canal cochléaire contiennent toujours la cytokératine 8, à savoir la Ph, la 3^e D, les T, les S et les H, toutes de façon hétérogène (Fig. 11L).

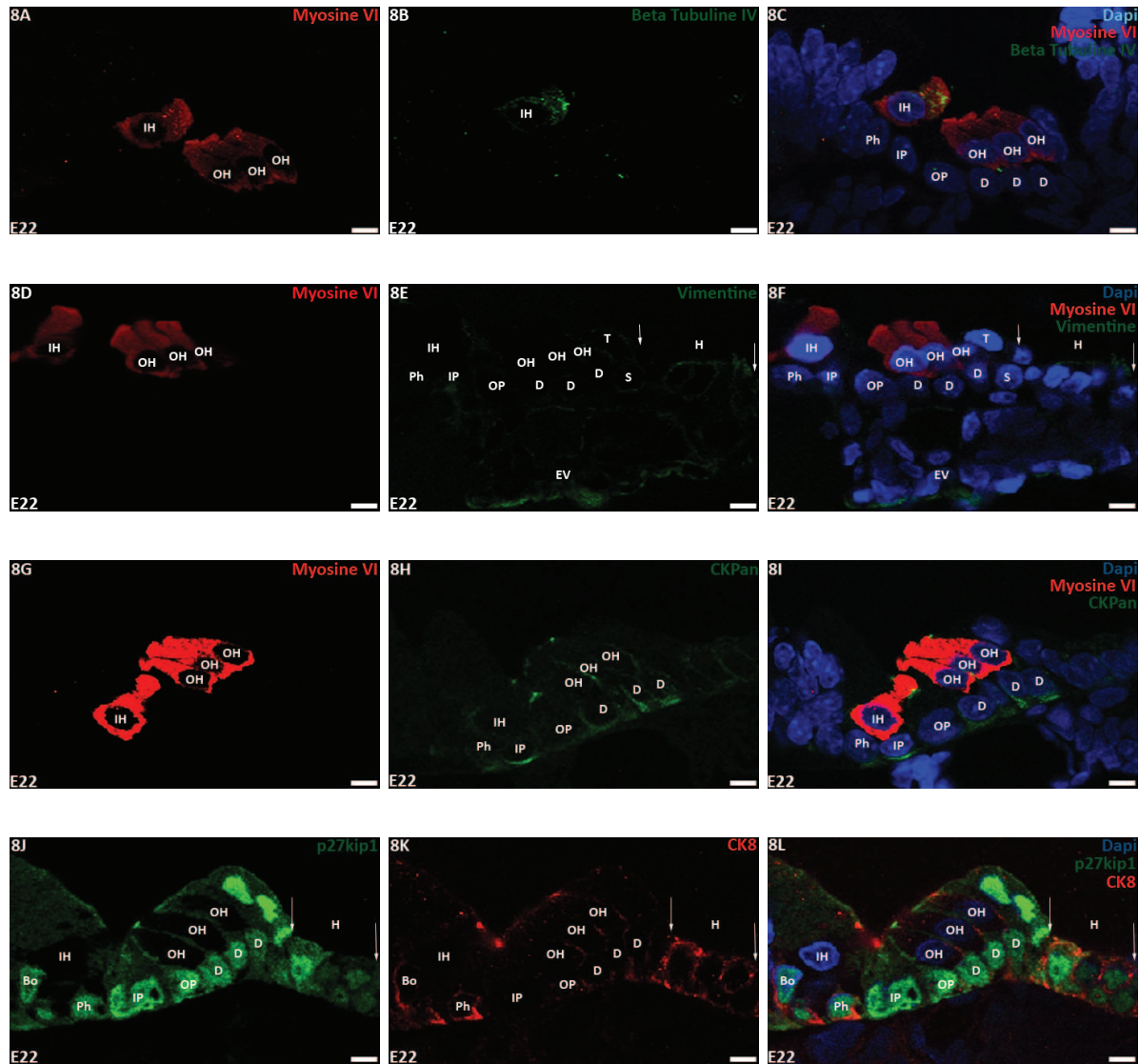


Figure 8. Mise en évidence de la myosine VI (A, C, D, F, G, I ; en rouge), de la tubuline β IV (B-C ; en vert), de la vimentine (E-F ; en vert), de la cytokératine Pan (H-I ; en vert), de la cytokératine 8 (K-L ; en rouge) et de la $p27^{kip1}$ (J, L) sur des cryosections dans la partie basale du canal cochléaire au stade E22. Le noyau des cellules est détecté par le Dapi (en bleu). Barres = 5 μ m (A, L). Bo : Cellule bordante ; D : Cellules de Deiters ; H : Cellules de Hensen ; IH : Cellule sensorielle interne ; IP : Cellule pilier interne ; MB : Membrane basilaire ; OH : Cellule sensorielle externe ; OP : Cellule pilier externe ; Ph : Cellule phalangeaire ; S : Cellules sous-tectales ; T : Cellules tectales.

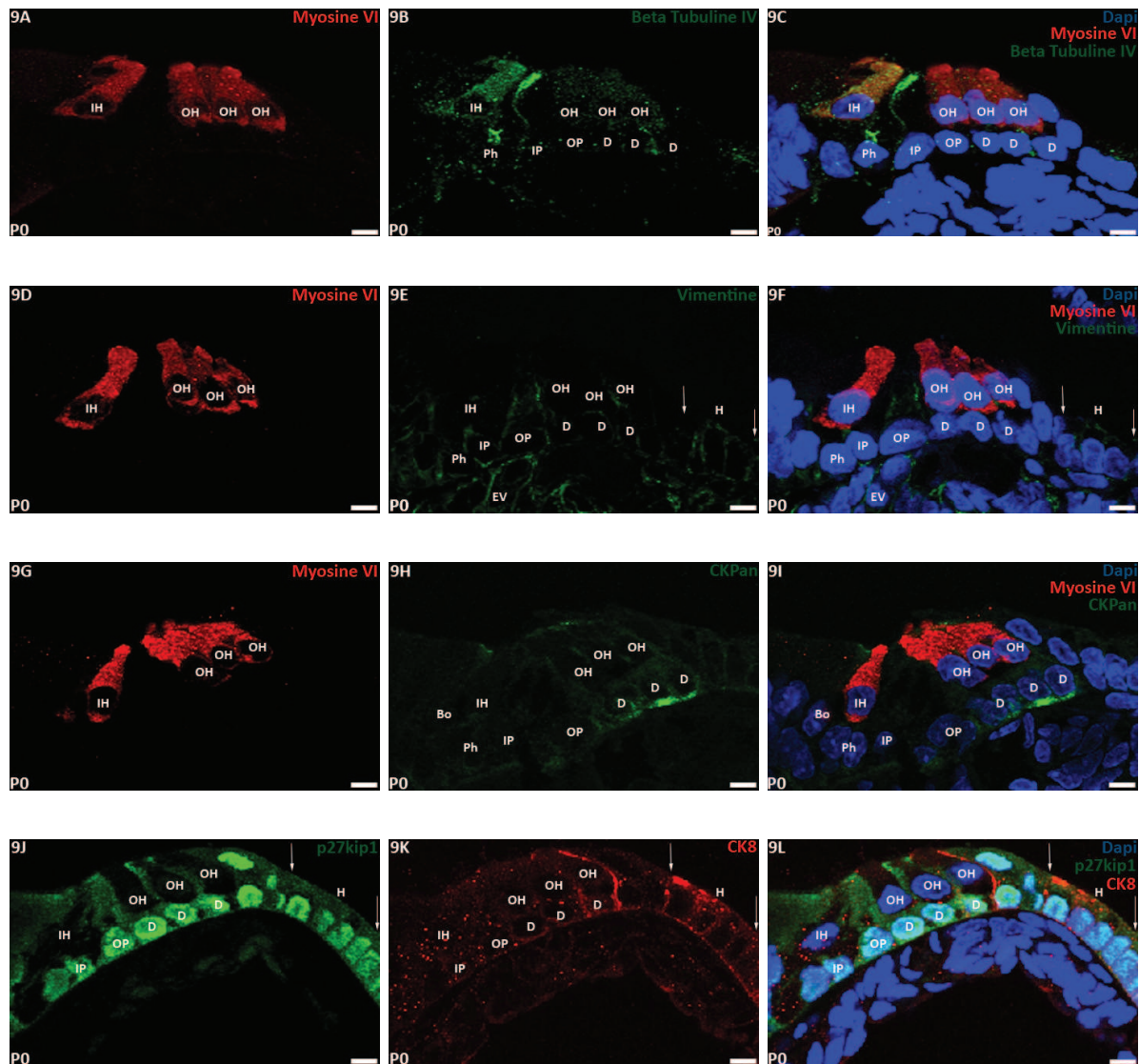


Figure 9. Mise en évidence de la myosine VI (A, C, D, F, G, I ; en rouge), de la tubuline β IV (B-C ; en vert), de la vimentine (E-F ; en vert), de la cytokératine Pan (H-I ; en vert), de la cytokératine 8 (K-L ; en rouge) et de la $p27^{kip1}$ (J, L) sur des cryosections dans la partie basale du canal cochléaire au stade P0. Le noyau des cellules est détecté par le Dapi (en bleu). Barres = 5 μ m (A, L). Bo : Cellule bordante ; D : Cellules de Deiters ; H : cellules de Hensen ; IH : Cellule sensorielle interne ; IP : Cellule pilier interne ; MB : Membrane basilaire ; OH : Cellule sensorielle externe ; OP : Cellule pilier externe ; Ph : Cellule phalangeaire.

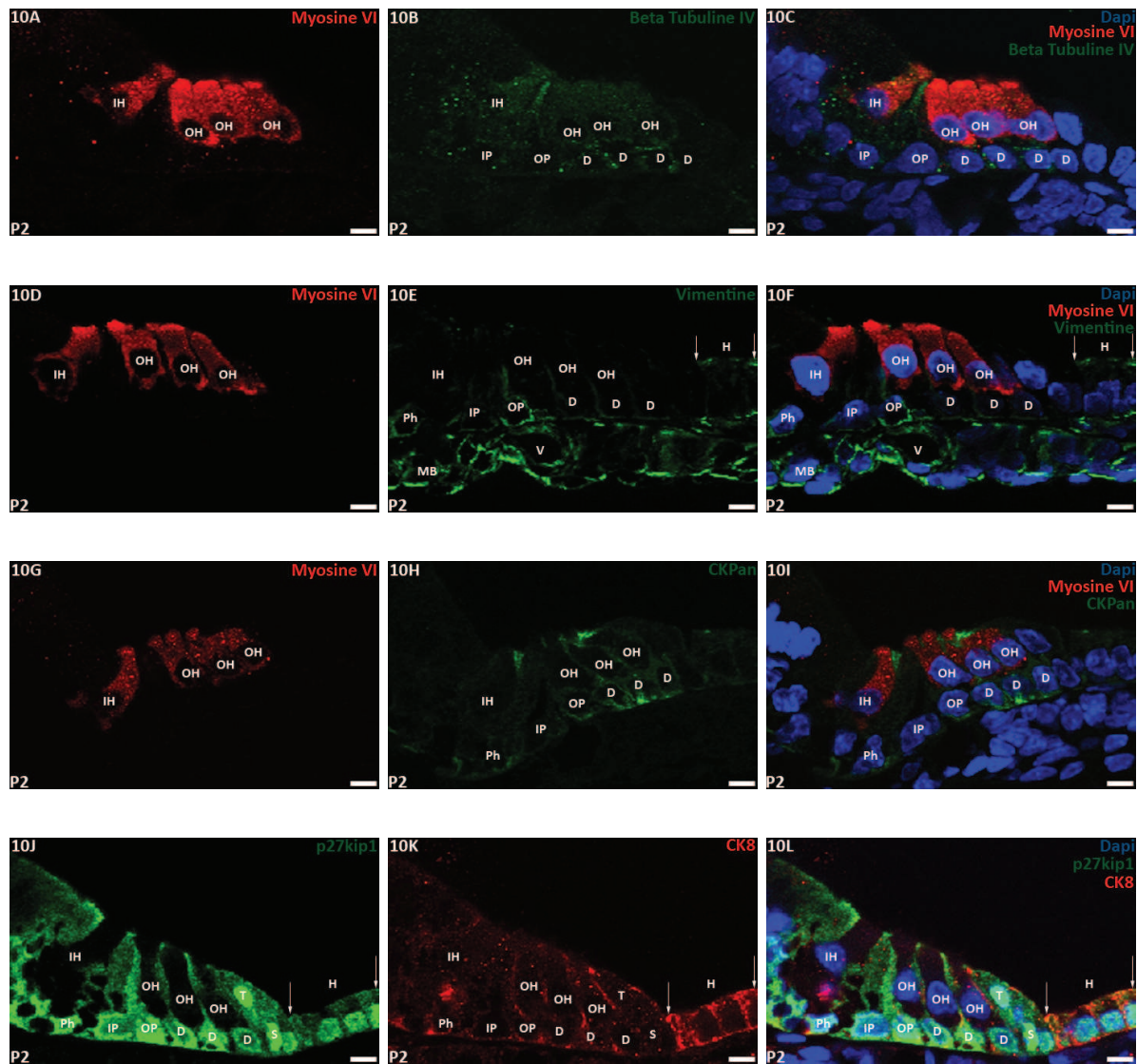


Figure 10. Mise en évidence de la myosine VI (A, C, D, F, G, I ; en rouge), de la tubuline β IV (B-C ; en vert), de la vimentine (E-F ; en vert), de la cytokératine Pan (H-I ; en vert), de la cytokératine 8 (K-L ; en rouge) et de la p27^{Kip1} (J, L) sur des cryosections dans la partie basale du canal cochléaire au stade P2. Le noyau des cellules est détecté par le Dapi (en bleu). Barres = 5 μ m (A-L). D : Cellules de Deiters ; H : Cellules de Hensen ; IH : Cellule sensorielle interne ; IP : Cellule pilier interne ; MB : Membrane basilaire ; OH : Cellule sensorielle externe ; OP : Cellule pilier externe ; Ph : Cellule phalangeaire ; V : Vaisseau spiral.

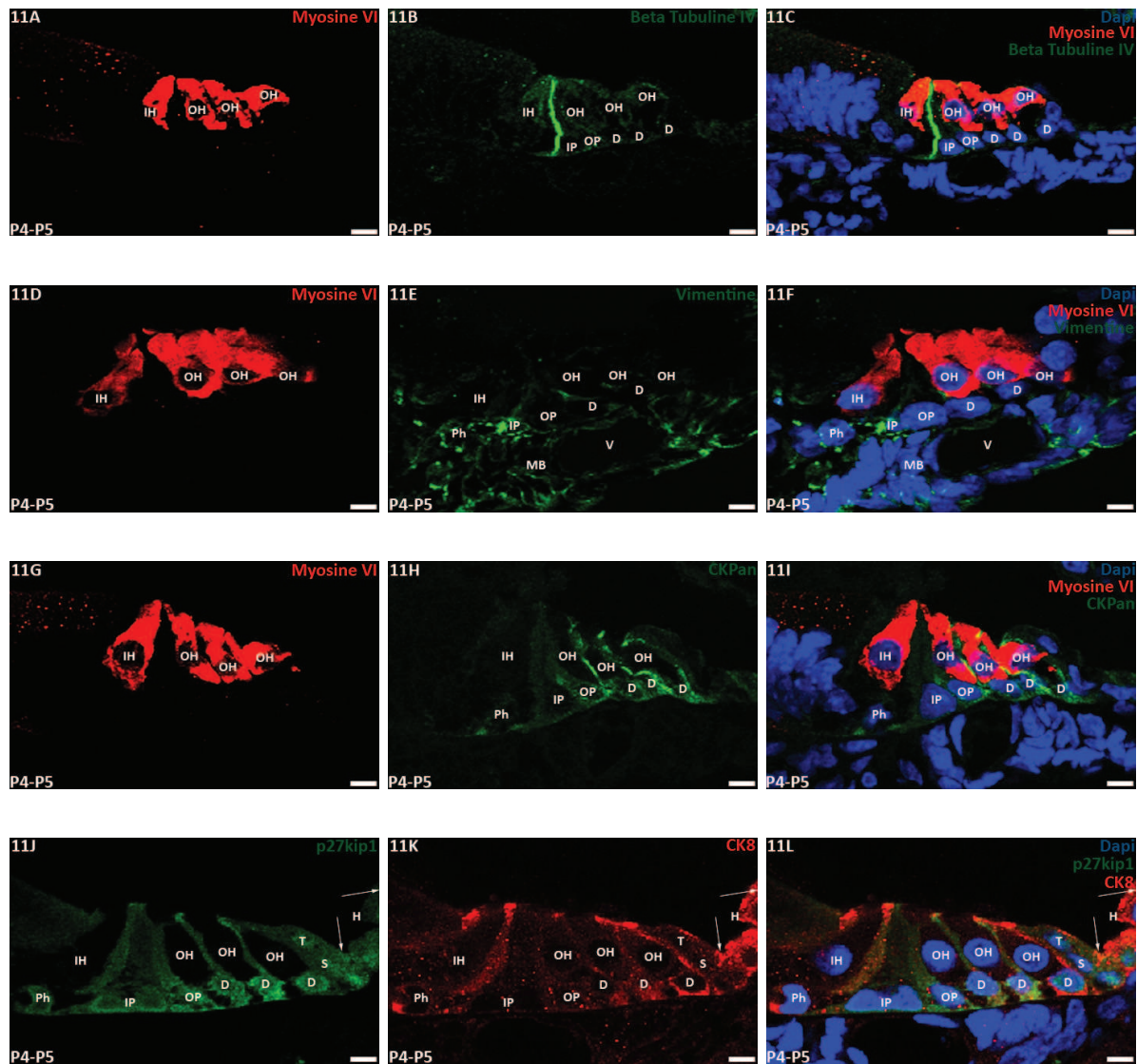


Figure 11. Mise en évidence de la myosine VI (A, C, D, F, G, I ; en rouge), de la tubuline β IV (B-C ; en vert), de la vimentine (E-F ; en vert), de la cytokératine Pan (H-I ; en vert), de la cytokératine 8 (K-L ; en rouge) et de la p27^{Kip1} (J, L) sur des cryosections dans la partie basale du canal cochléaire au stade P4-P5. Le noyau des cellules est détecté par le Dapi (en bleu). Barres = 5 μ m (A-L). D : Cellules de Deiters ; H : Cellules de Hensen ; IH : Cellule sensorielle interne ; IP : Cellule pilier interne ; MB : Membrane basilaire ; OH : Cellule sensorielle externe ; OP : Cellule pilier externe ; Ph : Cellule phalangeaire ; S : Cellules sous-tectales ; T : Cellules tectales ; V : Vaisseau spiral.

8) Rat de 6 jours

Six jours après la naissance, nous observons que les IP et les OP sont positives avec l'anticorps anti-tubuline β IV ; le marquage est hétérogène et n'apparaît plus sous la forme d'un faisceau de filaments apico-basal comme vu aux stades précédents (Fig. 12C). Enfin, le pôle apical de la 1^e D et le pôle basal de la 3^e D sont marqués avec cet anticorps.

Quant à la vimentine, elle est présente dans les cellules piliers ainsi que dans les D et les H de manière hétérogène (Fig. 12F). Dans une moindre mesure, elle est également trouvée au niveau du pôle basal de la Ph. Concernant la membrane basilaire, elle renferme clairement de la vimentine, en particulier, les cellules endothéliales du vaisseau spiral.

Nous pouvons noter que certaines cellules de l'épithélium dorsal de la cochlée sont marquées avec l'anticorps anti-cytokératine Pan (Fig. 12I). Celles-ci correspondent aux D, surtout la 2^e et la 3^e, à l'IP et à l'OP, mais faiblement au niveau de leur pôle apical.

A P6, le pôle basal et apical de la Ph, le pôle apical de la 1^e D, l'entièreté de la 3^e D, le pôle basal de la T, une S et les H sont les types cellulaires les plus marqués avec l'anticorps anti-cytokératine 8 (Fig. 12L). Un faible signal est également observé au niveau des cellules piliers.

9) Rat de 8 jours

A P8, nous observons que sur les cryosections mises en contact avec l'anticorps anti-tubuline β IV, les cellules piliers internes et externes sont marquées de façon hétérogène (Fig. 13C). Enfin, concernant les D, nous constatons que le marquage est principalement restreint à un filament apico-basal.

Sur les cryosections marquées avec l'anticorps anti-vimentine, nous voyons que seules l'IP et l'OP ainsi que la 1^e et la 3^e D, au niveau du pôle basal et le pôle apical d'une T sont marquées. Le marquage de la membrane basilaire est identique à celui observé à P6 (Fig. 13F).

C'est à ce stade du développement que l'immunofluorescence pour la cytokératine pan est plus prononcée (Fig. 13I). En effet, le pôle basal de la Ph, la Bo et les D sont clairement fluorescents. Dans une moindre mesure, le pôle apical et basal de l'IP, de l'OP, des T et des H sont marqués.

A ce stade, le signal obtenu avec l'anticorps anti-cytokératine 8 au niveau de l'épithélium dorsal de la cochlée est plus accentué au niveau de certaines de ses cellules (Fig. 13L). En effet, un évident marquage est présent dans la Ph, la Bo, les D sous la forme d'un prolongement apico-basal, les H, les T et les S. Un plus faible marquage est aussi observé au niveau du pôle apical et basal de l'IP et de l'OP.

10) Rat de 10 jours

Sur les cryosections mises en contact avec l'anticorps anti-tubuline β IV, l'IP, l'OP et les D sont les types cellulaires marqués (Fig. 14C).

C'est à ce stade que le marquage obtenu avec l'anticorps anti-vimentine est le plus évident. En effet, les régions basale et centrale de l'IP et de l'OP, le pôle basal des D et la région périnucléaire et la région basale de la Ph et de la Bo sont immunomarqués (Fig. 14F). Enfin, au niveau de la membrane basilaire et de l'endothélium du vaisseau spiral, le marquage est nettement visible.

A P10, au niveau de l'épithélium dorsal de la cochlée, nous constatons que l'intensité du marquage obtenu avec l'anticorps anti-cytokératine pan est plus prononcée qu'à P8. Les cellules positives avec cet anticorps correspondent à la Bo, à la Ph au niveau du pôle basal et aux 3 D avec un marquage hétérogène (Fig. 14I). Dans une moindre mesure, le pôle apical de l'IP et de l'OP, où des faisceaux de cytokératine paraissent plus structurés, et le pôle apical des T et des H sont également marqués par cet anticorps.

A ce stade du développement, le signal obtenu avec l'anticorps anti-cytokératine 8 au niveau de l'épithélium dorsal du canal cochléaire est plus intense dans certaines de ses cellules. En effet, la Ph et la Bo, les D, les T, les S et les H, au niveau de leur pôle apical, sont nettement positives (Fig. 14L). De la même manière qu'avec l'anticorps anti-cytokératine pan, il

apparaît que le marquage de la cytokératine 8 est organisé en filaments au niveau de l'IP et de l'OP.

11) Rat de 11-12 jours

Les immunomarquages obtenus avec l'anticorps anti-tubuline β IV sur les cryosections de rats âgés de 11 à 12 jours ont montré une positivité au niveau des D et des cellules piliers (Fig. 15C). Dans ces dernières, le marquage apparaît plus structuré.

Concernant la vimentine, à ce stade du développement, nous observons un marquage structuré au niveau du cytoplasme de l'IP et de l'OP, alors qu'il apparaît plus hétérogène au niveau du pôle basal des 3 D (Fig. 15F). Enfin, la membrane basilaire et l'endothélium du vaisseau spiral sont toujours positifs avec cet anticorps.

Le marquage obtenu sur les cryosections avec l'anticorps anti-cytokératine Pan est présent au niveau du pôle basal de la Ph et des D (Fig. 15I). De plus, un marquage moins intense mais plus structuré est visible au niveau du cytoplasme de l'IP et de l'OP. Enfin, un signal est révélé au niveau des T.

A P11-P12, nous constatons que l'immunomarquage obtenu avec l'anticorps anti-cytokératine 8 est évident au niveau du pôle basal de la Bo et de la Ph, ainsi que dans le cytoplasme de l'IP, de l'OP et des D (Fig. 15L). De plus, les T, les S, les H et l'épithélium de la strie vasculaire (non illustré sur la photographie) sont positifs avec cet anticorps.

12) Rat de 14-15 jours

A P14-P15, nous constatons que les cellules piliers sont clairement positives avec l'anticorps anti-tubuline β IV (Fig. 16C). Enfin, une faible positivité est visible au niveau du pôle basal des D.

A ce stade du développement, le marquage de la vimentine apparaît être structurée en filaments dans le cytoplasme de l'IP et de l'OP (Fig. 16F). De plus, le pôle basal des D et de la Ph est marqué. Enfin, la membrane basilaire est marquée avec l'anticorps anti-vimentine.

Concernant la cytokératine pan, le marquage est présent dans la Bo et le pôle basal de la Ph et des D (Fig. 16I). De plus, une faible positivité peut être vue au niveau de l'IP et l'OP.

A ce stade du développement postnatal, nous révélons que le pôle basal de la Ph et de la Bo et le cytoplasme des D, des T, des S et des H est marqué sur les cryosections mises en contact avec l'anticorps anti-cytokératine 8 (Fig. 17L). De plus, un marquage faible est détecté dans le cytoplasme de l'IP et de l'OP. Enfin, Les cellules de la membrane de Reissner sont encore faiblement marquées avec cet anticorps (non illustrées sur la photographie).

Il est important de signaler qu'aucun marquage n'est observé lorsque l'anticorps primaire est omis. De plus, avec l'anticorps anti-vimentine, nous avons toujours obtenu un marquage de la membrane basilaire, de l'endothélium du vaisseau spiral et des cellules cartilagineuses quel que soit le stade du développement examiné. Par contre, aucun signal n'a été révélé au niveau du ganglion spiral avec cet anticorps. Quant aux anticorps dirigés contre les cytokératines, nous avons constaté que seules les cellules épithéliales de la cochlée peuvent présenter un marquage ; aucun marquage n'a jamais été décelé au niveau des cellules d'origine mésodermique et ceci à aucun stade du développement.

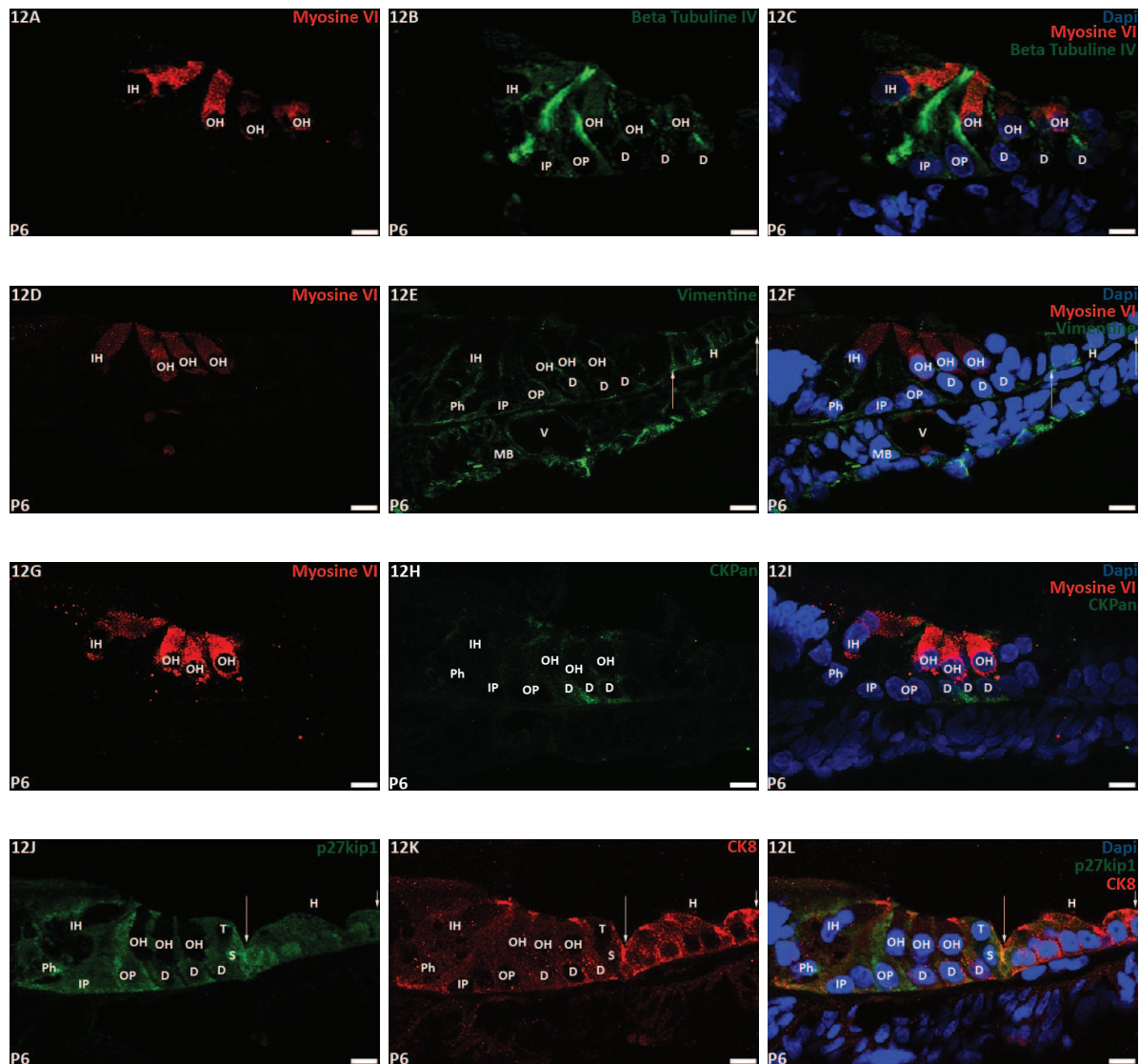


Figure 12. Mise en évidence de la myosine VI (A, C, D, F, G, I ; en rouge), de la tubuline β IV (B-C ; en vert), de la vimentine (E-F ; en vert), de la cytokératine Pan (H-I ; en vert), de la cytokératine 8 (K-L ; en rouge) et de la p27^{Kip1} (J, L) sur des cryosections dans la partie basale du canal cochléaire au stade P6. Le noyau des cellules est détecté par le Dapi (en bleu). Barres = 7,5 μ m (A-C, G-L) et 5 μ m (D-F). D : Cellules de Deiters ; H : Cellules de Hensen ; IH : Cellule sensorielle interne ; IP : Cellule pilier interne ; MB : Membrane basilaire ; OH : Cellule sensorielle externe ; OP : Cellule pilier externe ; Ph : Cellule phalangeaire ; S : Cellules sous-tectales ; T : Cellules tectales ; V : Vaisseau spiral.

3. RESULTATS

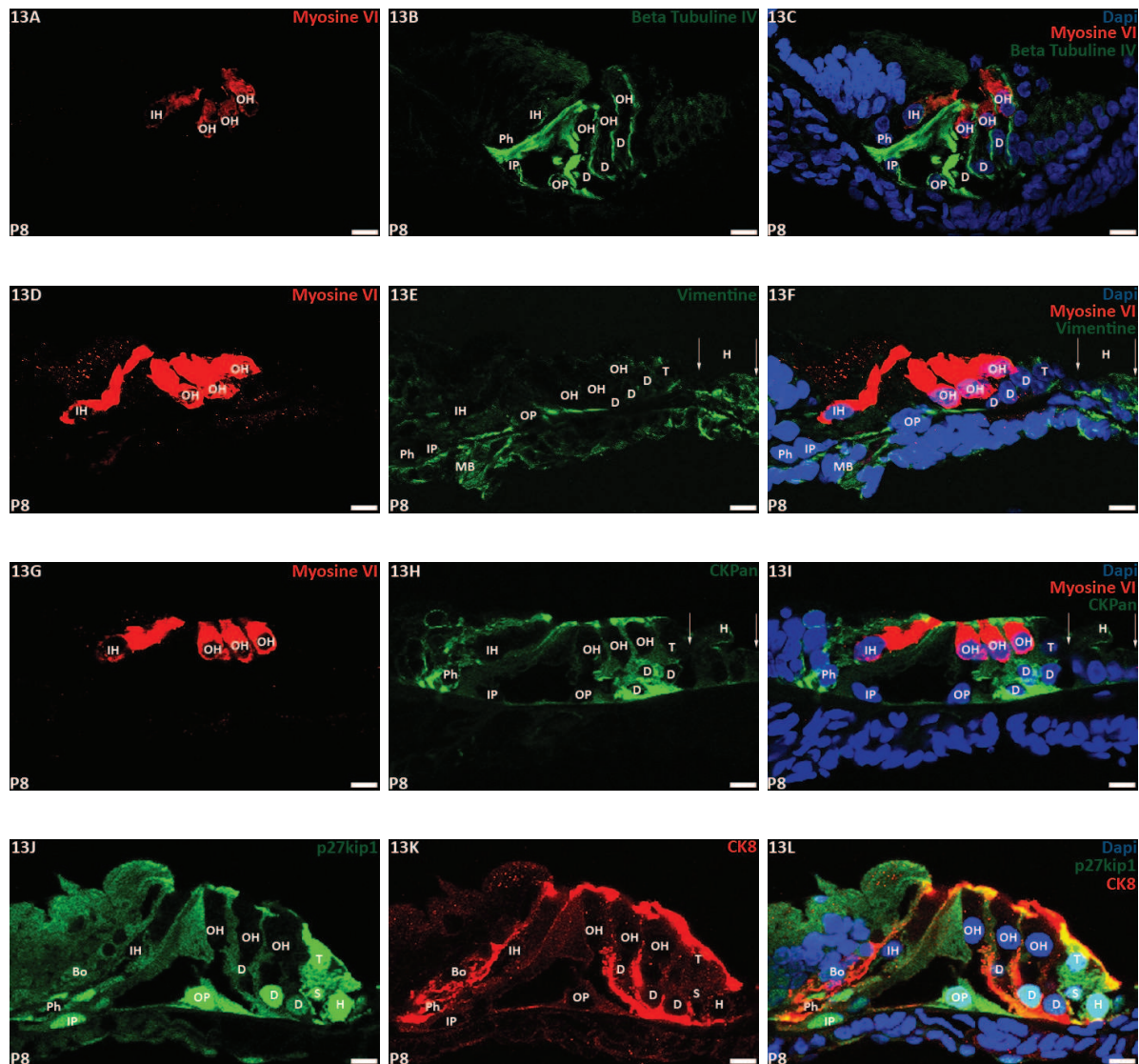


Figure 13. Mise en évidence de la myosine VI (A, C, D, F, G, I ; en rouge), de la tubuline β IV (B-C ; en vert), de la vimentine (E-F ; en vert), de la cytokératine Pan (H-I ; en vert), de la cytokératine 8 (K-L ; en rouge) et de la p27^{Kip1} (J, L) sur des cryosections dans la partie basale du canal cochléaire au stade P8. Le noyau des cellules est détecté par le Dapi (en bleu). Barres = 5 μ m (A-F) et 7,5 μ m (G-L). Bo : Cellule bordante ; C : Cellules de Claudius ; D : Cellules de Deiters ; H : Cellules de Hensen ; IH : Cellule sensorielle interne ; IP : Cellule pilier interne ; MB : Membrane basilaire ; OH : Cellule sensorielle externe ; OP : Cellule pilier externe ; Ph : Cellule phalangeaire ; S : Cellules sous-tectales ; T : Cellules tectales.

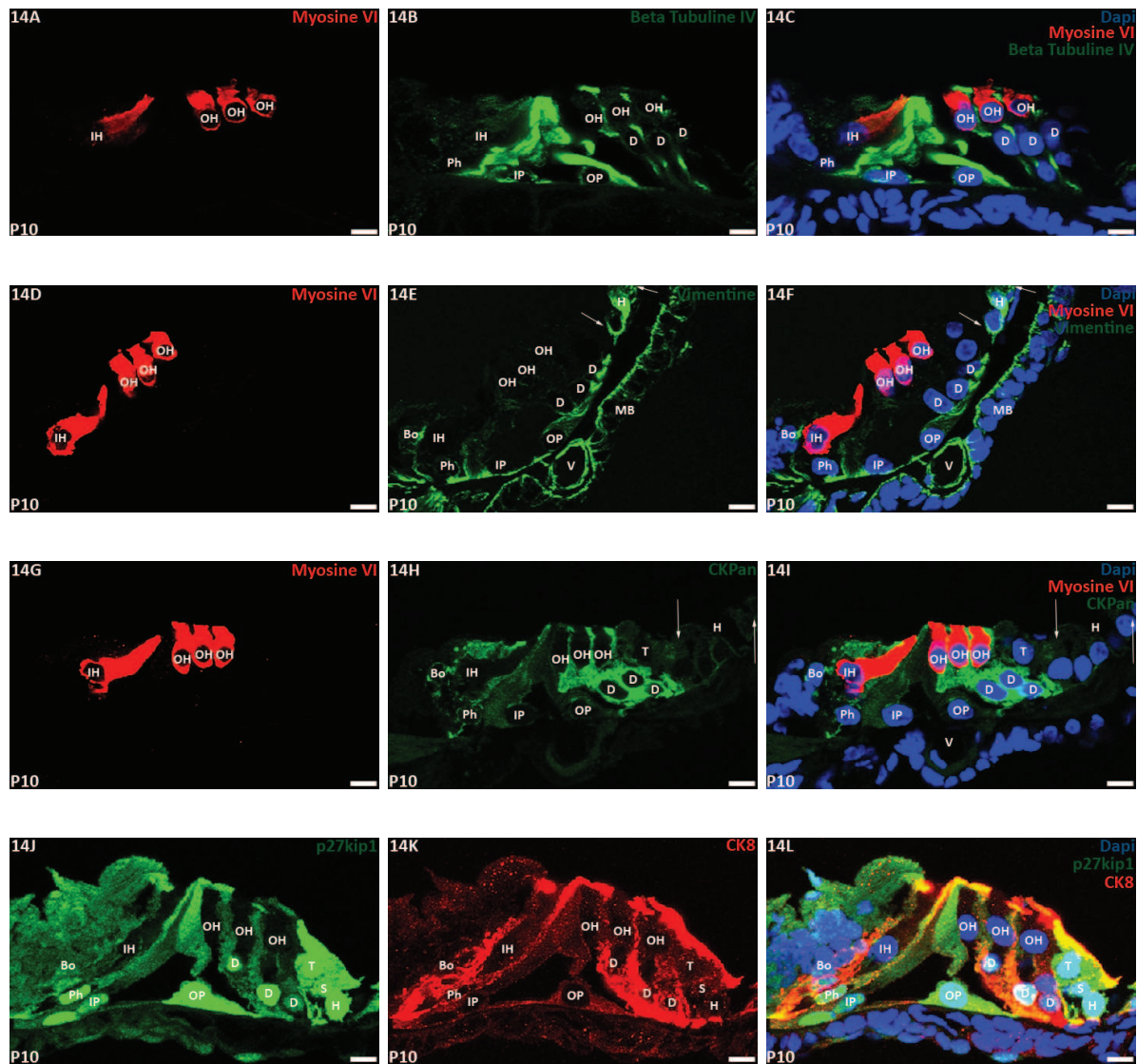


Figure 14. Mise en évidence de la myosine VI (A, C, D, F, G, I ; en rouge), de la tubuline β IV (B-C ; en vert), de la vimentine (E-F ; en vert), de la cytokératine Pan (H-I ; en vert), de la cytokératine 8 (K-L ; en rouge) et de la p27^{Kip1} (J, L) sur des cryosections dans la partie basale du canal cochléaire au stade P10. Le noyau des cellules est détecté par le Dapi (en bleu). Barres = 5 μ m (A-L). Bo : Cellule bordante ; D : Cellules de Deiters ; H : Cellules de Hensen ; IH : Cellule sensorielle interne ; IP : Cellule pilier interne ; MB : Membrane basilaire ; OH : Cellule sensorielle externe ; OP : Cellule pilier externe ; Ph : Cellule phalangeaire ; S : Cellules sous-tectales ; T : Cellules tectales ; V : Vaisseau spiral.

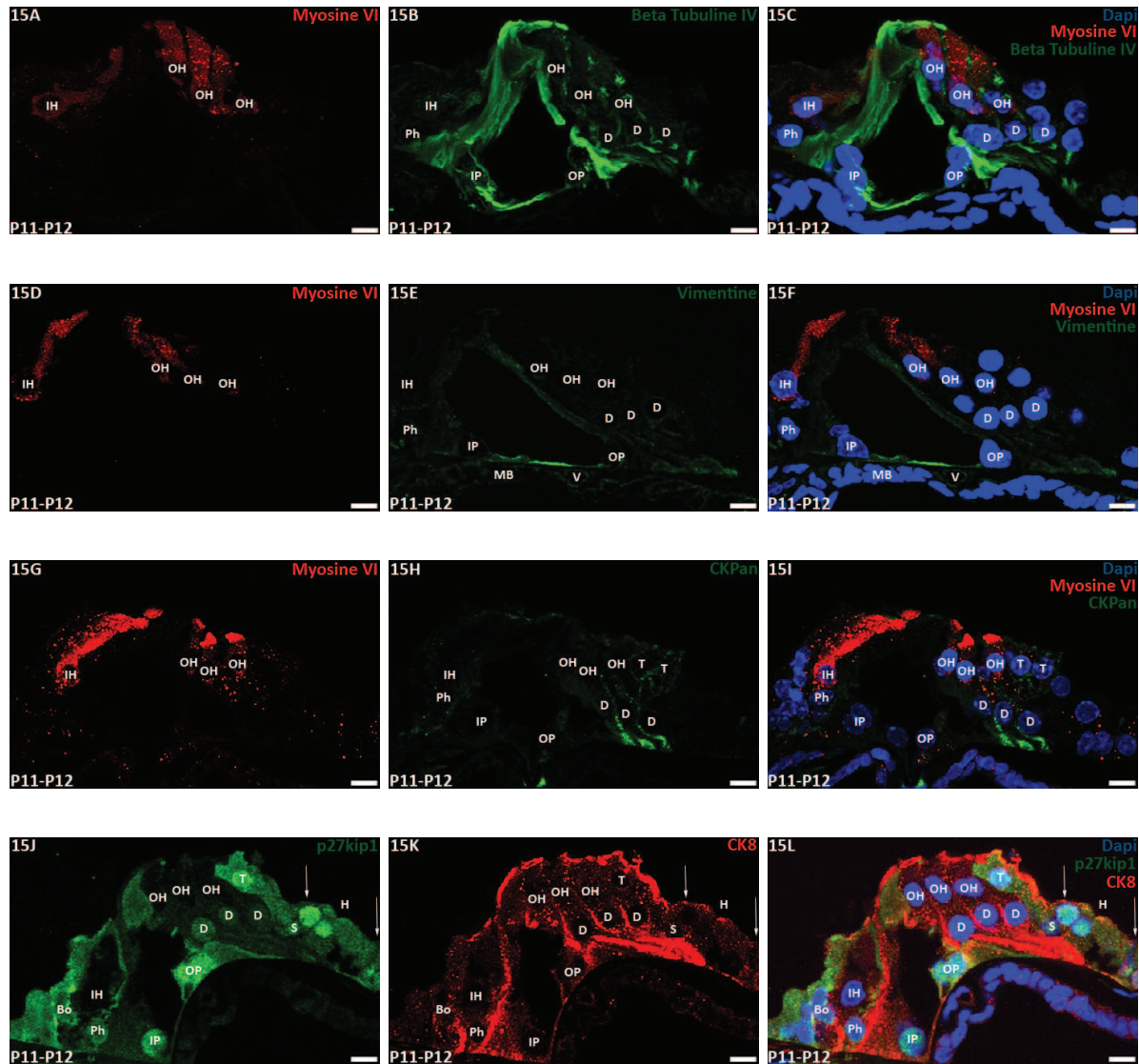


Figure 15. Mise en évidence de la myosine VI (A, C, D, F, G, I ; en rouge), de la tubuline β IV (B-C ; en vert), de la vimentine (E-F ; en vert), de la cytokératine Pan (H-I ; en vert), de la cytokératine 8 (K-L ; en rouge) et de la p27^{Kip1} (J, L) sur des cryosections dans la partie basale du canal cochléaire au stade P11-P12. Le noyau des cellules est détecté par le Dapi (en bleu). Barres = 7,5 μ m (A-L). Bo : Cellule bordante ; D : Cellules de Deiters ; H : Cellules de Hensen ; IH : Cellule sensorielle interne ; IP : Cellule pilier interne ; MB : Membrane basilaire ; OH : Cellule sensorielle externe ; OP : Cellule pilier externe ; Ph : Cellule phalangeaire ; S : Cellules sous-tectales ; T : Cellules tectales ; V : Vaisseau spiral.

3. RESULTATS

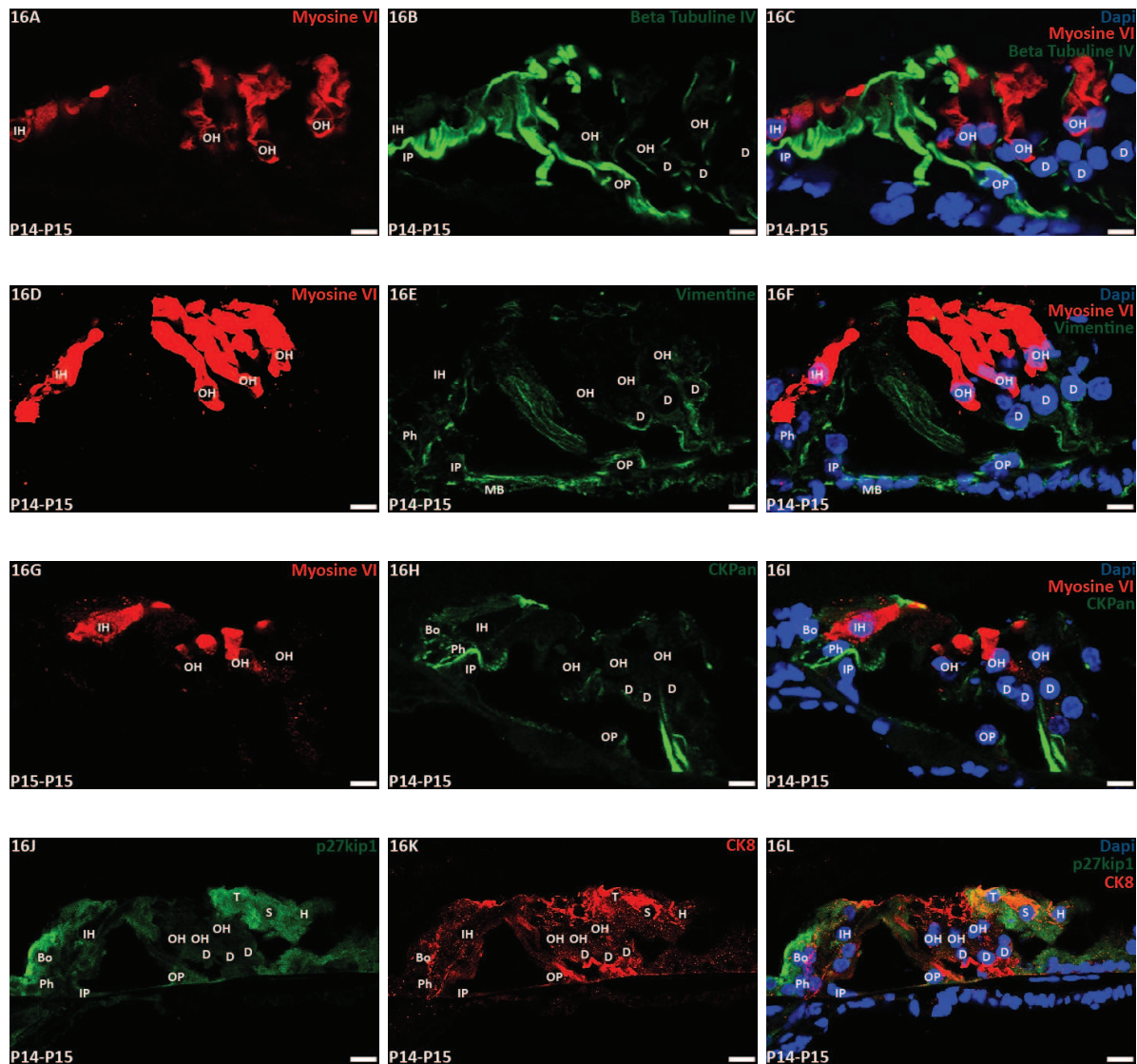


Figure 16. Mise en évidence de la myosine VI (A, C, D, F, G, I ; en rouge), de la tubuline β IV (B-C ; en vert), de la vimentine (E-F ; en vert), de la cytokératine Pan (H-I ; en vert), de la cytokératine 8 (K-L ; en rouge) et de la p27^{Kip1} (J, L) sur des cryosections dans la partie basale du canal cochléaire au stade P14-P15. Le noyau des cellules est détecté par le Dapi (en bleu). Barres = 7,5 μ m (A-I) et 5 μ m (J-L). Bo : Cellule bordante ; D : Cellules de Deiters ; H : Cellules de Hensen ; IH : Cellule sensorielle interne ; IP : Cellule pilier interne ; MB : Membrane basilaire ; OH : Cellule sensorielle externe ; OP : Cellule pilier externe ; Ph : Cellule phalangeaire ; S : Cellules sous-tectales ; T : Cellules tectales.

4. DISCUSSION

1) Localisation spatiotemporelle de la tubuline β IV

Nous sommes les premiers à démontrer la présence de tubuline β IV dans l'organe de Corti en développement chez le rat. En effet, notre étude portant sur la localisation de cette protéine a montré qu'elle est premièrement observée au niveau de l'IH (de E21 à P4-P5) (Fig. 7-11C), suivi des OH (de P0 à P4-P5) (Fig. 9-11C), de la Ph (à P0) (Fig. 9C), de l'IP (de P0 à P15) (Fig. 9-16C), des D (de P0 à P15) (Fig. 9-16C) et enfin de l'OP (de P4-P5 à P15) (Fig. 11-16C). Ainsi, en accord avec Hallworth et al. (2000) chez la gerbille, cette protéine est d'abord présente dans les cellules sensorielles (Fig. 7C) et ensuite dans les cellules de soutien (Fig. 9C).

De plus, nous montrons que l'IH est marquée avant l'OH (Fig. 7-9C). En ce qui concerne le développement postnatal, les stades où cette protéine est détectée au sein des cellules sensorielles ne semblent pas en relation avec les modifications morphologiques de celles-ci décrites par Vago et al. (1995) et Hallworth et al. (2000). En effet, l'évolution du marquage de la tubuline β IV au cours du développement n'explique pas ces modifications. Il serait pertinent d'effectuer des études complémentaires avec un marqueur spécifique des microtubules des cellules sensorielles, comme la tubuline β II. Les travaux réalisés par Furness et al. (1990), Kuhn and Vater (1995) et Heather et al. (2003) sur cette protéine ne se sont limités qu'à l'organe de Corti mature. Néanmoins, Roth and Bruns (1992) ont observé une élimination de mitochondries et d'une partie du réticulum endoplasmique chez le rat entre P0 et P20. Cette diminution drastique du nombre d'organites va de pair avec la différenciation cytologique des cellules sensorielles. La tubuline β IV que nous avons mis en évidence entre E21 et P4-P5 pourrait jouer un rôle dans cette réduction d'organites.

Concernant les cellules de soutien, presque tous les types cellulaires sont marqués. Premièrement, les isoformes de tubuline diffèrent entre les cellules sensorielles et les cellules de soutien. En effet, chez la gerbille, ceux présents dans ces dernières sont des formes leur conférant une grande stabilité et longévité fournissant un support structurel à l'organe de Corti alors que les isoformes des cellules sensorielles sont plus dynamiques mais aussi moins stables (Pack and Slepecky, 1995 ; Bane et al., 2002). Ensuite, le marquage localisé dans les cellules piliers diffère dans le temps, à savoir la cellule pilier interne avant

la cellule pilier externe (Fig. 9-11C). De plus, nous avons observé l'apparition d'un faisceau de filaments apico-médian entre P0 et P2 (Fig. 9-10C) qui se transformera en un faisceau de filaments apico-basal à P4-P5 (Fig. 11C). En effet, certains auteurs ont suggéré qu'un large réseau de réticulum endoplasmique lisse est présent à l'apex de l'IP entre P0 et P2 chez la gerbille et migrerait vers le pôle basal à partir de P6 (Nakazawa et al., 1995 ; Spicer et al., 2000). Enfin, l'important marquage que nous observons à P8 serait à mettre en relation avec l'ouverture du tunnel de Corti (Fig. 13C). Ce dernier apparaît aux alentours de P8 chez le rat (Roth and Bruns, 1992).

Les mêmes constatations peuvent être faites à propos des cellules de Deiters. La localisation de microtubules à partir de P0 (Fig. 9C) pourrait avoir un lien avec la présence d'un réticulum endoplasmique lisse au niveau de leur pôle apical (Spicer and Schulte, 1993 ; Nakazawa, Schulte and Spicer, 1995 ; Spicer, Smythe and Schulte, 1999). A partir de P10, la formation des espaces de Nuel (Ito et al., 1995 ; Hallworth et al., 2000) expliquerait l'important marquage que nous constatons (Fig. 14C).

Enfin, nous montrons pour la première fois que la tubuline β IV est présente au niveau de la cellule phalangeaire à P0 (Fig. 9C). Cependant, nous n'avons aucune interprétation fonctionnelle concernant ce marquage. Des investigations futures sont nécessaires.

2) Localisation spatiotemporelle de la cytokératine et de la vimentine

Nous constatons que toutes les cellules épithéliales du canal cochléaire renferment de la cytokératine pan hormis les cellules sensorielles (Fig. 5-6H, 7-16I), confirmant l'étude de Kuijpers et al. (1991) chez la souris. Cependant, le marquage plus intense au niveau des cellules piliers et des cellules de Deiters entre P8 et P10 (Fig. 13-15I) pourrait être mis en relation avec, respectivement, l'ouverture du tunnel de Corti et la formation des espaces de Nuel. Les cytokératines joueraient ainsi leur rôle de charpente (Kuijpers et al. 1991).

De plus, nous observons une importante fluorescence au niveau de la membrane de Reissner et de la strie vasculaire dès E18 (Fig. 5-6H, 7I), en relation directe avec leur formation (Spicer and Schulte, 1998).

Un marquage similaire s'observe avec l'anticorps anti-cytokératine 8 (Fig 5-6K, 7-16L) mais il est toutefois plus étendu notamment au niveau de la cellule bordante (8-16L) et des cellules tectales et sous-tectales (Fig. 11-16L) car elles ne sont pas marquées avec l'anticorps anti-cytokératine pan. Cette divergence pourrait s'interpréter par un possible site antigénique différent entre ces deux anticorps et/ou par la concentration de cytokératine 8 dans le cytokératine pan.

Excepté les cellules sensorielles, tectales et sous-tectales, la majorité des types cellulaires de la cochlée est marquée avec l'anticorps anti-vimentine (Fig. 5-6E, 7-16F), notamment l'épithélium dorsal du canal cochléaire. Ce résultat est surprenant car la vimentine est connue comme étant une protéine caractéristique des cellules d'origine mésodermique. Ainsi, le marquage de la strie vasculaire pourrait être dû à la présence des mélanocytes (Ramaeckers et al., 1983 ; Schrott and Spöndling, 1987 ; Kasper et al., 1987, 1989 ; Schrott et al., 1988).

Néanmoins, la co-localisation de la cytokératine et de la vimentine a été notée par différents auteurs pendant le développement et à l'âge adulte (Schulte and Adams 1989 ; Kasper et al 1987). Ainsi, lors du développement, Anniko et al. (1987) avaient observé ce phénomène dans quelques types cellulaires chez l'humain à 4 mois de gestation et Wilkström et al. (1988) l'avaient constaté chez la souris. Ainsi, ce phénomène de co-localisation serait lié à la différenciation cellulaire (Viebahn et al., 1987). Chez le rat adulte, nous avons observé surtout cette combinaison dans les cellules de soutien. Certaines études l'avaient déjà remarquée mais les données étaient contradictoires. En effet, Raphael et al. (1987) ne trouvaient aucune présence de vimentine dans la cochlée adulte de gerbille alors que Oesterle et al. (1990) avaient démontré qu'il y en avait aussi bien au niveau des cellules piliers que des cellules de Deiters chez le même animal. Chez l'humain, Arnold and Anniko (1990) n'en avaient trouvé que dans les cellules piliers alors qu'elle était aussi présente au niveau de la cellule bordante, des cellules de Deiters et du sillon externe d'après nos observations et celles de Schulte and Adams (1989) chez le rat. Ces divergences pourraient être partiellement dues à la différence des espèces utilisées, mais devraient aussi être causées par l'anticorps utilisé et des différences de procédures de fixation et de

décalcification qui interféreraient significativement avec la détectabilité des sites antigéniques respectifs.

La présence d'une forte concentration de vimentine dans les cellules épithéliales est fréquemment observée durant le développement de nombreux organes comme le rein (Carev et al., 2008) ou encore le pancréas (Bouwens et al., 1996 ; Di Bella et al., 2009) mais aussi et surtout, dans les cellules cancéreuses (Joyce et al., 2009 ; Zhi et al., 2009). Comme proposé par plusieurs auteurs (Acloque et al., 2009), cette transition épithélio-mésenchymateuse permettrait aux cellules épithéliales d'acquérir une plus grande liberté de déplacement.

Enfin, en sachant que nos marquages sont plus intenses entre P8 et P15 dans les cellules piliers et les cellules de Deiters (Fig. 13-16F), il est tentant de supposer que la présence de vimentine est en rapport avec l'ouverture du tunnel de Corti et la formation des espaces de Nuel. Cependant, cette hypothèse reste à être démontrée.

5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Notre travail sur l'étude de la localisation spatiotemporelle de la tubuline β IV, de la vimentine et de la cytokératine au niveau de l'organe de Corti nous a permis de répondre à certaines questions :

- L'apparition de la tubuline β IV prend place à partir de E21 alors que la vimentine et la cytokératine sont déjà présentes à E18 ;
- Il semble également que la différenciation des cellules de soutien, en particulier l'apparition de leur cytosquelette spécialisé, se déroule préférentiellement après la naissance ;
- La vimentine pourrait posséder un rôle fondamental dans le développement de l'organe de Corti et de ses structures adjacentes en offrant par exemple une mobilité cellulaire plus accentuée au niveau des cellules piliers et des cellules de Deiters ;
- Les trois protéines étudiées auraient un rôle à jouer dans le développement de l'organe de Corti car les marquages les plus importants s'observent lors de l'ouverture du tunnel de Corti entre les cellules piliers à P8 et lors de l'apparition des espaces de Nuel entre les cellules de Deiters et leur cellule sensorielle externe à P10 chez le rat ;
- Les constituants du cytosquelette changent entre les cellules de soutien et les cellules sensorielles. Concernant la tubuline β IV, elle est caractérisée par sa forte présence au niveau des cellules de soutien mise à part une apparition dans les cellules sensorielles entre E21 et P4-P5. Aucune présence de vimentine et de cytokératine ne sont observées au niveau des cellules sensorielles chez le rat ;
- La présence de tubuline β IV au niveau de la cellule phalangeaire à P0 n'avait jamais été décrite jusqu'à présent.

Nous pensons qu'il serait utile d'examiner la localisation des autres isotopes de tubuline beta au cours du développement de manière systématique afin de compléter notre étude

5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

sur la différenciation des cellules de l'organe de Corti. Concernant la vimentine, son rôle et son affinité avec les cytokératines durant le développement de l'organe de Corti pourraient être mieux appréhendés en étudiant des souris transgéniques n'exprimant pas la vimentine. Il existe également d'autres protéines du cytosquelette telles que l'actine beta et l'actine gamma qui pourraient jouer un rôle dans le développement de l'organe de l'audition.

C'est en continuant à travailler de manière systématique qu'il nous sera possible de suivre le possible parallélisme existant entre la présence de protéines du cytosquelette dans les différents types cellulaires et le développement de l'organe de Corti. De plus, nos résultats concernent en grande partie la différenciation des cellules de soutien. Des études complémentaires seront nécessaires afin de comprendre le développement du cytosquelette au sein des cellules sensorielles.

6. BIBLIOGRAPHIE

6. BIBLIOGRAPHIE

- Abdouh, A., G. Despres & R. Romand (1993)** HAIR CELL OVERPRODUCTION IN THE DEVELOPING MAMMALIAN COCHLEA IN CULTURE. *Neuroreport*, 5, 33-36.
- Acloque, H., Adams, M.S., Fishwick, K., Bronner-Fraser, M. & Nieto, M.A. (2009)** Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest.*, 119(6), 1438-1449.
- Ameen, N. A., Y. Figueroa & P. J. I. Salas (2001)** Anomalous apical plasma membrane phenotype in CK8-deficient mice indicates a novel role for intermediate filaments in the polarization of simple epithelia. *Journal of Cell Science*, 114, 563-575.
- Anniko, M. & W. Arnold (1995)** CYTOSKELETAL PROTEINS IN HUMAN HAIR-CELLS. *Acta Otolaryngologica*, 8-12.
- Anniko, M., Thornell, L.E. & Virtanen, I. (1987)** Cytoskeletal organisation of the human inner ear. *Act Otolaryngologica (Stockh)*, Suppl. 437, 49-55.
- Arnold, W. & Anniko M. (1990)** Das Zytokeratinskelet des menschlichen Corti-Organ und seine funktionelle Bedeutung. *Z. Laryngol-Rhino-Otol.* 69, 24-30.
- Arjmand, E., D. Harris & P. Dallos (1988)** DEVELOPMENTAL-CHANGES IN FREQUENCY MAPPING OF THE GERBIL COCHLEA - COMPARISON OF 2-COCHLEAR LOCATIONS. *Hearing Research*, 32, 93-96.
- Bane, B. C., T. H. MacRae, H. Xiang, J. Bateman & N. B. Slepecky (2002)** Microtubule cold stability in supporting cells of the gerbil auditory sensory epithelium: correlation with tubulin post-translational modifications. *Cell and Tissue Research*, 307, 57-67.
- Bauwens, L., J. E. Veldman, F. C. S. Ramaekers, H. Bouman & E. H. Huizing (1991)** EXPRESSION OF INTERMEDIATE FILAMENT PROTEINS IN THE ADULT HUMAN COCHLEA. *Annals of Otology Rhinology and Laryngology*, 100, 211-218.
- Bouwens, L. & E. DeBlay (1996)** Islet morphogenesis and stem cell markers in rat pancreas. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 44, 947-951.
- Broekaert, D. (1993)** Cytoskeletal polypeptides: Cell-type specific markers useful in investigative otorhinolaryngology. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 27, 1-20.
- Carev, D., M. Saraga & M. Saraga-Babic (2008)** Expression of intermediate filaments, EGF and TGF- α in early human kidney development. *Journal of Molecular Histology*, 39, 227-235.
- Chen, P. & N. Segil (1999)** p27^{Kip1} links cell proliferation to morphogenesis in the developing organ of Corti. *Development*, 126, 1581-1590.
- Couloigner, V., M. Teixeira, O. Sterkers, H. Rask-Andersen & E. Ferrary (2004)** The endolymphatic sac: its roles in the inner ear. *M S-Medecine Sciences*, 20, 304-+.
- Di Bella, A., M. Regoli, C. Nicoletti, L. Ermini, L. Fonzi & E. Bertelli (2009)** An Appraisal of Intermediate Filament Expression in Adult and Developing Pancreas: Vimentin Is Expressed in alpha Cells of Rat and Mouse Embryos. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 57, 577-586.

6. BIBLIOGRAPHIE

- Furness, D. N., C. M. Hackney & P. S. Steyger (1990)** ORGANIZATION OF MICROTUBULES IN COCHLEAR HAIR-CELLS. *Journal of Electron Microscopy Technique*, 15, 261-279.
- Furness, D. N., Y. Katori, S. Mahendrasingam & C. M. Hackney (2005)** Differential distribution of beta- and gamma-actin in guinea-pig cochlear sensory and supporting cells. *Hearing Research*, 207, 22-34.
- Hallworth, R. & R. F. Luduena (2000)** Differential expression of beta tubulin isotypes in the adult gerbil cochlea. *Hearing Research*, 148, 161-172.
- Hallworth, R., M. McCoy & J. Polan-Curtain (2000)** Tubulin expression in the developing and adult gerbil organ of Corti. *Hearing Research*, 139, 31-41.
- Hasson, T., P. G. Gillespie, J. A. Garcia, R. B. MacDonald, Y. D. Zhao, A. G. Yee, M. S. Mooseker & D. P. Corey (1997)** Unconventional myosins in inner-ear sensory epithelia. *Journal of Cell Biology*, 137, 1287-1307.
- Ito, M., S. S. Spicer & B. A. Schulte (1995)** CYTOLOGICAL CHANGES RELATED TO MATURATION OF THE ORGAN OF CORTI AND OPENING OF CORTIS TUNNEL. *Hearing Research*, 88, 107-123.
- Jensen-Smith, H. C., J. Eley, P. S. Steyger, R. F. Luduena & R. Hallworth (2003)** Cell type-specific reduction of beta tubulin isotypes synthesis in the developing gerbil organ of Corti. *Journal of Neurocytology*, 32, 185-197.
- Joyce, T., D. Cantarella, C. Isella, E. Medico & A. Pintzas (2009)** A molecular signature for Epithelial to Mesenchymal transition in a human colon cancer cell system is revealed by large-scale microarray analysis. *Clinical & Experimental Metastasis*, 26, 569-587.
- Kaltenbach, J. A. & P. R. Falzarano (1994)** POSTNATAL-DEVELOPMENT OF THE HAMSTER COCHLEA .1. GROWTH OF HAIR-CELLS AND THE ORGAN OF CORTI. *Journal of Comparative Neurology*, 340, 87-97.
- Kaltenbach, J. A., P. R. Falzarano & T. H. Simpson (1994)** POSTNATAL-DEVELOPMENT OF THE HAMSTER COCHLEA .2. GROWTH AND DIFFERENTIATION OF STEREOCILIA BUNDLES. *Journal of Comparative Neurology*, 350, 187-198.
- Kasper, M., Stosiek, P., Varga, A., & Karsten, U. (1987)** Immunohistochemical demonstration of the coexpression of vimentin and cytokeratin(s) in the guinea pig cochlea. *Arch. Otorhinolaryngol.* 244, 66-68.
- Kasper, M. (1989)** Patterns of cytokeratin/vimentin coexpression in the guinea pig. *Acta Histochem.* 86, 85-91.
- Katsumoto, T., A. Mitsushima & T. Kurimura (1990)** THE ROLE OF THE VIMENTIN INTERMEDIATE FILAMENTS IN RAT 3Y1-CELLS ELUCIDATED BY IMMUNOELECTRON MICROSCOPY AND COMPUTER-GRAPHIC RECONSTRUCTION. *Biology of the Cell*, 68, 139-146.
- Kelley, M. W. (2007)** Cellular commitment and differentiation in the organ of Corti. *International Journal of Developmental Biology*, 51, 571-583.

6. BIBLIOGRAPHIE

- Kuhn, B. & M. Vater (1995)** THE ARRANGEMENTS OF F-ACTIN, TUBULIN AND FODRIN IN THE ORGAN OF CORTI OF THE HORSESHOE BAT (*RHINOLOPHUS-ROUXI*) AND THE GERBIL (*MERIONES-UNGUICULATUS*). *Hearing Research*, 84, 139-156.
- Kuhn, B. & M. Vater (1996)** The early postnatal development of F-actin patterns in the organ of Corti of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) and the horseshoe bat (*Rhinolophus rouxi*). *Hearing Research*, 99, 47-70.
- Kuijpers, W., T. A. Peters, E. Tonnaer & F. C. S. Ramaekers (1991)** EXPRESSION OF CYTOKERATIN POLYPEPTIDES DURING DEVELOPMENT OF THE RAT INNER-EAR. *Histochemistry*, 96, 511-521.
- Kuijpers, W., E. Tonnaer, T. A. Peters & F. C. S. Ramaekers (1992)** DEVELOPMENTALLY-REGULATED COEXPRESSION OF VIMENTIN AND CYTOKERATINS IN THE RAT INNER-EAR. *Hearing Research*, 62, 1-10.
- Leonova, E. V. & Y. Raphael (1999)** Application of a platinum replica method to the study of the cytoskeleton of isolated hair cells, supporting cells and whole mounts of the organ of Corti. *Hearing Research*, 130, 137-154.
- Malgrange, B., M. Thiry, T. R. Van De Water, L. Nguyen, G. Moonen & P. P. Lefebvre (2002)** Epithelial supporting cells can differentiate into outer hair cells and Deiters' cells in the cultured organ of Corti. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, 1744-1757.
- Montcouquiol, M. & M. W. Kelley (2003)** Planar and vertical signals control cellular differentiation and Patterning in the mammalian cochlea. *Journal of Neuroscience*, 23, 9469-9478.
- Mu, M. Y., S. Chardin, P. Avan & R. Romand (1997)** Ontogenesis of rat cochlea. A quantitative study of the organ of Corti. *Developmental Brain Research*, 99, 29-37.
- Nakazawa, K., B. A. Schulte & S. S. Spicer (1995)** THE ROSETTE COMPLEX IN GERBIL DEITERS CELLS CONTAINS GAMMA-ACTIN. *Hearing Research*, 89, 121-129.
- Nishizaki, K., M. Anniko, Y. Orita, K. Karita, Y. Masuda & T. Yoshino (1998)** Programmed cell death in the developing epithelium of the mouse inner ear. *Acta Oto-Laryngologica*, 118, 96-100.
- Oesterle, E.C., Vijay Sarthy, P., & Rubel, E.W. (1990)** Intermediate filaments in the inner ear of normal and experimentally damaged guinea pig. *Hearing Research* 47, 1-16.
- Pack, A. K. & N. B. Slepecky (1995)** Cytoskeletal and calcium-binding proteins in the mammalian organ of Corti: Cell type-specific proteins displaying longitudinal and radial gradients. *Hearing Research*, 91, 119-135.
- Pirvola, U., J. Ylikoski & I. Virtanen (1990)** IMMUNOHISTOCHEMICAL LOCALIZATION OF NONERYTHROID SPECTRIN (FODRIN) IN THE SENSORY CELLS OF THE VESTIBULAR END ORGANS OF THE RAT AND GUINEA-PIG. *Orl-Journal for Oto-Rhino-Laryngology and Its Related Specialties*, 52, 127-132.
- Qvortrup, K. and Rostgaard, J. (1990)** Three-dimensional organization of a transcellular tubulocisternal endoplasmic reticulum in epithelial cells of Reissner's membrane in the guinea-pig. *Cell Tissue Res.* 261,287-299

6. BIBLIOGRAPHIE

- Ramaekers**, F.C.S., Haag, D., Kant, A., Moesker, O., Jap, P.H.K. & Vooijs, G.P. (1983) Coexpression of keratin and vimentin type intermediate filaments in human metastatic carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 2618-2622.
- Randall**, D., Burggren W. & French K. (1999). *Eckert Physiologie Animale, mécanismes et adaptations*. 4^e ed. De Boeck université s.a., Paris, Bruxelles.
- Raphael**, Y. & R. A. Altschuler (2003) Structure and innervation of the cochlea. *Brain Research Bulletin*, 60, 397-422.
- Raphael**, Y., B. D. Athey, Y. Wang, M. K. Lee & R. A. Altschuler (1994) F-ACTIN, TUBULIN AND SPECTRIN IN THE ORGAN OF CORTI - COMPARATIVE DISTRIBUTION IN DIFFERENT CELL-TYPES AND MAMMALIAN-SPECIES. *Hearing Research*, 76, 173-187.
- Raphael**, Y., Marshak, G., Barash, A. & Geiger, B. (1987) Modulation of intermediate filament expression in developing cochlear epithelium. *Differentiation*, 35, 151-162.
- Roach**, M.C., Boucher, V.L., Walss, C., Ravdin, P.M. & Luduena, R.F. (1998) Preparation of a Monoclonal Antibody Specific for the Class I Isotype of β -Tubulin: The β Isotypes of Tubulin Differ in Their Cellular Distributions Within Human Tissues. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 39, 273-285
- Roth**, B. & V. Bruns (1992) POSTNATAL-DEVELOPMENT OF THE RAT ORGAN OF CORTI .2. HAIR CELL RECEPTORS AND THEIR SUPPORTING ELEMENTS. *Anatomy and Embryology*, 185, 571-581.
- Rueda**, J., R. Cantos & D. J. Lim (1996) Tectorial membrane-organ of Corti relationship during cochlear development. *Anatomy and Embryology*, 194, 501-514.
- Rueda**, J., J. J. Prieto, M. E. Rubio, A. Gutierrez & J. A. Merchan (1993) DEVELOPMENT OF THE TECTAL CELLS IN THE MOUSE COCHLEA. *Anatomy and Embryology*, 187, 425-432.
- Sarria**, A. J., S. R. Panini & R. M. Evans (1992) A FUNCTIONAL-ROLE FOR VIMENTIN INTERMEDIATE FILAMENTS IN THE METABOLISM OF LIPOPROTEIN-DERIVED CHOLESTEROL IN HUMAN SW-13 CELLS. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 19455-19463.
- Schrott**, A. & Spoendling, H. (1987) Pigment anomaly associated inner ear deafness. *Acta Otolaryngologica (Stockh)* 103, 451-457.
- Schrott**, A, Egg, G. & Spoendling, H. (1988) Intermediate filaments in the cochleas of normal and mutant (w/w^v , sl/sl^d) mice. *Arch Otorhinolaryngologica* 245, 250-254.
- Schulte**, B.A. & Adams, J.C. (1989) Immunohistochemical localization of vimentin in the gerbill inner ear. *J. Histochem. Cytochem.* 37, 1787-1797.
- Spicer**, S. A., G. N. Thomopoulos & B. A. Schulte (2000) Structural evidence for ion transport and tectorial membrane maintenance in the gerbil limbus. *Hearing Research*, 143, 147-161.
- Spicer**, S. S. & B. A. Schulte (1993) CYTOLOGIC STRUCTURES UNIQUE TO DEITERS CELLS OF THE COCHLEA. *Anatomical Record*, 237, 421-430.

6. BIBLIOGRAPHIE

- Spicer**, S. S. & B. A. Schulte (1994) ULTRASTRUCTURAL DIFFERENTIATION OF THE FIRST HENSEN CELL IN THE GERBIL COCHLEA AS A DISTINCT CELL-TYPE. *Anatomical Record*, 240, 149-156.
- Spicer**, S. S. & B. A. Schulte (1998) Evidence for a medial K⁺ recycling pathway from inner hair cells. *Hearing Research*, 118, 1-12.
- Spicer**, S. S., N. Smythe & B. A. Schulte (1999) Distribution of canalicular reticulum in Deiters cells and pillar cells of gerbil cochlea. *Hearing Research*, 130, 7-18.
- Thelen**, N., I. Breuskin, B. Malgrange & M. Thiry (2009) Early identification of inner pillar cells during rat cochlear development. *Cell and Tissue Research*, 337, 1-14.
- Vago**, P., C. Ripoll, R. Tournebize & M. Lenoir (1996) Distribution of actin and tubulin in outer hair cells isolated from developing rat cochlea: A quantitative study. *European Journal of Cell Biology*, 69, 308-315.
- Vater**, M., M. Lenoir & R. Pujol (1997) Development of the organ of Corti in horseshoe bats: Scanning and transmission electron microscopy. *Journal of Comparative Neurology*, 377, 520-534.
- Viebahn**, C., Lane, E.B, Ramaekers, F.C.S (1987) The mesonephric (Wolfian) and paramesonephric (Müllerian) ducts of golden hamster express different intermediate filament proteins during development. *Differentiation* 34, 175-188.
- Wheater**, P.R., Young, B. and Heath, J.W. (2001) Les organes des sens. In *Histologie Fonctionnelle*. 1^e ed. De Boeck & Larcier s.a., bruxelles pp 394-401.
- Wilkström**, S.O., Anniko, M., Thornell, L.E. & Virtanen, I. (1988) Development stade-dependent pattern of inner ear expression of intermediate filaments. *Acta Otolaryngologica* (Stockh) 106, 71-80.
- Yamasoba**, T. & K. Kondo (2006) Supporting cell proliferation after hair cell injury in mature guinea pig cochlea in vivo. *Cell and Tissue Research*, 325, 23-31.
- Zhi**, L., L. Bing, L. Yang, L. Bo-Ning & H. Quan (2009) Cystic papillary meningioma with subarachnoid dissemination: A case report and review of the literature. *Pathology Research and Practice*, 205, 582-587.
- Zine**, A. & R. Romand (1996) Development of the auditory receptors of the rat: A SEM study. *Brain Research*, 721, 49-58.

L'organe de l'audition chez les mammifères est sans doute l'une des plus remarquables structures rencontrées chez les vertébrés supérieurs. Cet organe, qui porte le nom de celui qui l'a décrit pour la première fois à la moitié du XIX^{ème} siècle (Alfonso Corti, 1851), possède un arrangement cellulaire complexe et hautement ordonné. L'organe de Corti est situé sur la face dorsale du canal cochléaire, au sein de l'oreille interne. Il est composé de cellules sensorielles reposant sur des cellules de soutien. Trois rangées de cellules sensorielles externes et une rangée de cellules sensorielles internes sont réparties de part et d'autre du tunnel de Corti, lui-même limité par les cellules piliers externes et internes. Chaque cellule sensorielle est séparée de la suivante par une cellule de soutien, les cellules de Deiters du côté externe et les cellules phalangeaires du côté interne. À l'état mature, cette structure est bien connue ; cependant, notre connaissance de la mise en place du cytosquelette dans ces différentes cellules hautement spécialisées de l'organe de l'audition en développement reste largement parcellaire et incomplète.

Dans ce mémoire, nous avons analysé en microscopie confocale à balayage laser le développement de l'organe de Corti entre le 18^e jour embryonnaire et le 15^e jour post-natal. Pour appréhender le cytosquelette, nous avons utilisé les anticorps anti-tubuline β IV, anti-vimentine, anti-cytokératine pan (CK 1, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18 et 19), et anti-cytokératine 8. Seule la partie basale du canal cochléaire et les structures adjacentes ont été examinées.

Nous observons que la tubuline β IV est présente au niveau des cellules sensorielles internes entre E21 et P4-P5, au niveau des cellules sensorielles externes entre P0 et P4-P5, de la cellule phalangeaire à P0, au niveau de la cellule pilier interne et au niveau des cellules de Deiters entre P0 et P15 et enfin au niveau de la cellule pilier externe entre P4-P5 et P15 ; ainsi, cette protéine est d'abord présente dans les cellules sensorielles et ensuite dans les cellules de soutien. Enfin, nous montrons pour la première fois que la cellule phalangeaire est marquée à P0 avec cet anticorps.

Nous décelons également une positivité dans toutes les cellules épithéliales du canal cochléaire, et en particulier au niveau des cellules piliers et au niveau des cellules de Deiters entre P8 et P12, avec les deux anticorps anti-cytokératine utilisés.

Nous localisons de la vimentine au sein de l'épithélium du canal cochléaire alors que celle-ci est typique des cellules d'origine mésodermique. Cette transition épithélio-mésenchymateuse permettrait aux cellules épithéliales d'acquérir une plus grande liberté de mouvement.

Finalement, nous suggérons que les marquages préférentiels des cellules piliers et des cellules de Deiters entre P8 et P12 obtenus avec les quatre anticorps étudiés pourraient être corrélés avec la formation du tunnel de Corti et des espaces de Nuel dans l'organe de l'audition.